

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA – UFSC
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS – CFM
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES QUÍMICO-BIOLÓGICAS
DE *Tabebuia heptaphylla*

ALUNA: PATRICIA ORBEM VERONEZI
ORIENTADOR: PROF. DR. MOACIR G. PIZZOLATTI

Trabalho de conclusão de curso –
Bacharelado em Química, referente
à disciplina QMC 5512 – Estágio II

FLORIANÓPOLIS, NOVEMBRO DE 2008.

Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC
Centro de Ciências Físicas e Matemáticas – CFM
Departamento de Química

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES QUÍMICO-BIOLÓGICAS DE *Tabebuia*
*heptaphylla***

Trabalho de conclusão de curso –
Bacharelado em Química, referente à
disciplina QMC 5512 – Estágio II

Patricia Orbem Veronezi
Aluna

Prof. Dr. Moacir G. Pizzolatti
Orientador

*“Quaisquer que sejam as suas lutas e
aspirações no ruído do tumulto da vida,
mantenha PAZ em sua alma”.*
(MAX EHRMANN)

*...Dedico este trabalho aos meus pais,
Egeu e Laura,
Amor eterno!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida.

Aos meus pais, Egeu e Laura pelo amor, dedicação e apoio que tornaram essa conquista possível.

Aos meus irmãos, Egeu Augusto e Luciane, pela compreensão e amizade.

Ao professor Dr. Moacir Pizzolatti pela oportunidade e pelos ensinamentos e a professora Dr. Inês Brighente pelo apoio.

A todo o grupo LQPN: Analice, Andressa, Cristian, Eduardo, Henrique, Heros, Juliana e Mariana, pela ajuda e pelos impagáveis momentos de descontração.

A Aline Alvarez Zacarias responsável pelo estudo inicial da espécie no grupo, pela organização impecável de seu material que me auxiliou muito, pela disponibilidade e toda ajuda.

Aos meus parentes que residem em Florianópolis por todo auxílio, em especial ao meu primo, Robson Veronezi Campos, por toda ajuda e apoio.

Aos amigos que participaram de forma direta ou indireta, estando presentes ou não nesta caminhada em especial a Gabriela, Mariana, Marli e Raquel.

Aos professores e funcionários do Curso de Graduação em Química pela colaboração, auxílio e convivência que contribuiu para minha formação.

A UFSC, Central de Análises e ao Departamento de Química pela formação e suporte que possibilitaram a realização deste trabalho.

Ao CNPQ-Capes, pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
1 RESUMO.....	1
2 INTRODUÇÃO.....	2
2.1 A Importância dos Produtos Naturais	2
2.2 Compostos fenólicos e a atividade antioxidante.....	3
2.3 Gênero <i>Tabebuia</i>	4
2.4 Espécie <i>Tabebuia heptaphylla</i>	5
3 OBJETIVOS	11
3.1 Objetivo Geral	11
3.2 Objetivos Específicos	11
4 MATERIAL E MÉTODOS	12
4.1 Substâncias utilizadas	12
4.2 Equipamentos	12
4.3 Coleta e identificação da <i>Tabebuia heptaphylla</i>	13
4.4 Obtenção do extrato bruto da <i>T. heptaphylla</i>	13
4.5 Extrações ácido-base	14
4.5.1 Parte I	14
4.5.2 Parte II	15
4.6 Fracionamentos.....	17
4.6.1 Parte I	17
4.6.2 Parte II	19
4.7 Testes antioxidantes.....	21
4.7.1 Determinação do teor de fenólicos totais	21
4.7.2 Determinação do potencial redutor	22
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.1 Extrato	24

5.2 Parte I.....	24
5.2.1 Obtenção e caracterização do Ácido Anísico.....	25
5.2.2 Obtenção e caracterização do Ácido Verátrico	26
5.3 Parte II.....	28
5.3.1 Obtenção do β -Sitosterol e Stigmasterol	29
5.4 Testes antioxidantes.....	32
6 CONCLUSAO	34
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
8 ANEXOS	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Folhas, flores, sementes e tronco da <i>Tabebuia heptaphylla</i>	6
Figura 02: Compostos presentes em espécies do gênero <i>Tabebuia</i>	8
Figura 03: Compostos presentes na <i>Tabebuia heptaphylla</i>	10
Figura 04: Fluxograma da obtenção do extrato bruto.	13
Figura 05: Fluxograma da sequência de extrações.	14
Figura 06: Fluxograma do primeiro procedimento de extrações.	15
Figura 07: Fluxograma do segundo procedimento de extrações.	16
Figura 08: Curva de calibração com ácido gálico para conteúdo de fenólicos.	22
Figura 09: Curva de calibração com ácido ascórbico para conteúdo de fenólicos.	23
Figura 10: Estrutura química do Ácido Anísico	26
Figura 11: Estrutura química do Ácido Verátrico	28
Figura 12: Estrutura química do Stigmasterol	30
Figura 13: Estrutura química do β – Sitosterol	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Classificação taxonômica da <i>Tabebuia heptaphylla</i>	5
Tabela 02: Sistema de eluição empregado na cromatografia em pH \approx 3.....	17
Tabela 03 Sistema de eluição empregado na cromatografia da Fr. pH \approx 8	18
Tabela 04: Sistema de eluição empregado na cromatografia em pH \approx 3 1ºProcedimento	19
Tabela 05: Sistema de eluição empregado na cromatografia em pH \approx 3 2ºProcedimento	20
Tabela 06: Valores comparativos de RMN ^{13}C para Ip-8	31
Tabela 07: Atividade antioxidante do EB e frações da <i>T. heptaphylla</i>	33

LISTA DE ABREVIATURAS

CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
d	Dupleto
Fr	Fração
IV	Infravermelho
J	Constante de Acoplamento
m	Multiplete
PF	Ponto de Fusão
ppm	Partes por milhão
R _f	Fator de Retenção
RMN ¹ H	R essonância M agnética N uclear de Hidrogênio
RMN ¹³ C	R essonância M agnética N uclear de Carbono 13
δ	Deslocamento Químico
s	Singleto
t	Tripleto
UV	Ultravioleta

1 RESUMO

O ipê-roxo, *Tabebuia heptaphylla*, pertence à família das Bignoniaceae, típica de regiões tropicais. É uma árvore de grande valor decorativo, ótima para parques e jardins. A madeira, como a de quase todos os ipês (gênero *Tabebuia*) é de cerne resistente, prestando-se para diversos trabalhos de marcenaria e carpintaria. O ipê-roxo apresenta grande utilização na medicina popular no tratamento de diversas enfermidades e estudos têm relatado que a espécie possui propriedades medicinais.

Estudos fitoquímicos realizados com *Tabebuia heptaphylla* revelaram a presença de derivados do ácido benzóico, quinonas, naftoquinonas, flavonóides, iridóides glicosilados e terpenóides. Neste trabalho objetivou-se realizar um novo estudo fitoquímico com as cascas da espécie, direcionado à obtenção de derivados do ácido benzóico através de extrações ácido-base e avaliação de seu potencial antioxidante.

Com o extrato hidroalcoólico obtido após maceração exaustiva das cascas de *Tabebuia heptaphylla* foram realizadas extrações com AcOEt fazendo variações no pH.

Em uma primeira seqüência de extrações as frações ácida e básica foram submetidas à cromatografia em coluna. Deste procedimento dois derivados do ácido benzóico foram obtidos, respectivamente, o Ácido Anísico e o Ácido Verátrico os quais foram identificados por IV, RMN ^1H e RMN ^{13}C .

Outras duas seqüências de extrações com variações no pH foram realizadas. Da cromatografia em coluna na qual as frações ácidas foram submetidas a fracionamento, novamente foram isolados os derivados do ácido benzóico, identificados por comparação de perfil cromatográfico e IV. Da fração proveniente da extração iniciada com o pH ácido uma mistura de β -Sitosterol e Stigmasterol foi obtida e identificada por IV, RMN ^1H e RMN ^{13}C .

A determinação do teor de fenólicos totais e do potencial redutor foi realizada com todas as frações e com o extrato hidroalcoólico. O teor de fenólicos obtido nas frações ácidas foi semelhante. O potencial redutor foi maior em frações que apresentaram maiores teores para fenólicos corroborando com a atividade antioxidante atribuída aos mesmos.

2 INTRODUÇÃO

2.1 A Importância dos Produtos Naturais

O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto à espécie humana. Ainda hoje nas regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e cultivadas em quintais residenciais ¹.

O uso de produtos naturais como matéria-prima para a síntese de substâncias bioativas, especialmente fármacos, tem sido amplamente relatado ao longo do tempo. As plantas são fontes importantes de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para síntese de um grande número de fármacos. Apesar do aumento de estudos nessa área, dados de 1996 revelam que apenas 15 a 17% das plantas tiveram seu potencial medicinal investigado ².

O isolamento e o estudo de substâncias naturais é uma preocupação central das ciências químicas e biológicas. A bioquímica investiga a química de produtos naturais oriundos do metabolismo primário, que produz substâncias essenciais para a vida e amplamente distribuídas nos seres vivos: aminoácidos, lipídios, carboidratos e macromoléculas (proteínas, polissacarídeos e ácidos nucleicos) ³.

A química dos produtos naturais tem por objetivo imediato o esclarecimento e registro dos constituintes resultantes do metabolismo secundário dos seres vivos, através do isolamento e elucidação de suas estruturas moleculares. A importância científica das pesquisas desenvolvidas nesta área se traduz tanto pelos resultados obtidos com a consecução de seus objetivos imediatos (são conhecidos hoje milhares de compostos naturais) como pela aplicação imediata ou mediata destes resultados a outras áreas científicas correlatas. O crescente desenvolvimento de novas técnicas analíticas, como a cromatografia, e o constante aperfeiçoamento dos instrumentos de análise espectrométrica têm na química de produtos naturais, ao lado da bioquímica, sua força motora ⁴.

2.2 Compostos fenólicos e a atividade antioxidante

Embora os vegetais contenham milhares de constituintes químicos, as propriedades terapêuticas estão especialmente relacionadas aos chamados metabólitos secundários. Alcalóides, terpenos, esteróides, flavonóides, cumarinas, xantonas, lignanas, fenilpropanóides, acetofenonas, cromonas, quinonas, derivados do ácido benzóico são classes representativas de metabólitos secundários presentes nas plantas ^{2,5}.

Compostos fenólicos constituem uma mistura complexa de produtos originados do metabolismo secundário das plantas, que diferem em estrutura química e reatividade. São constituídos quimicamente por pelo menos um anel aromático no qual, ao menos, um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila ².

A diversidade estrutural dos compostos fenólicos interfere em seu comportamento físico-químico como solubilidade e fenômeno de partição. Fenóis de plantas são solúveis em água e em solventes orgânicos, ionizáveis em pKa entre 8 e 12. Assim, eles possuem grande diversidade de acidez e solubilidade ⁶.

Os compostos fenólicos de plantas enquadram-se em diversas categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas ⁷.

Todos os compostos fenólicos absorvem energia radiante na região do ultravioleta e esta característica fornece a base para a quantificação espectrofotométrica de fenólicos totais. Estes métodos não são específicos e podem superestimar o conteúdo fenólico, entretanto são bastante utilizados pela praticidade e simplicidade ⁶.

Nos últimos anos, uma substancial quantidade de resultados tem colocado em evidência o papel chave dos radicais livres e outros oxidantes como grandes responsáveis em parte pelo processo de envelhecimento e favorecendo o aparecimento de doenças degenerativas associadas ao envelhecimento, como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais ⁸. A produção de radicais livres é controlada nos seres vivos por diversos compostos antioxidantes, tais como:

ácido ascórbico (vitamina C) que combate os radicais livres nos fluídos orgânicos, tocoferóis (vitamina E) e carotenóides que por sua vez mantêm o equilíbrio de radicais livres nos tecidos adiposos, polifenóis, e selênio ⁹.

A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou seqüestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à sua estabilização por ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias ⁷.

2.3 Gênero *Tabebuia*

Os ipês são árvores de porte mediano, em sua maioria silvestres, pertencem ao gênero *Tabebuia*, antes dito *Tecoma* da família Bignoniaceae ¹⁰.

A família Bignoniaceae compreende 120 gêneros e 800 espécies, de ampla distribuição nas regiões tropicais de todo o mundo, especialmente freqüentes nos trópicos americanos. No Brasil ocorrem cerca de 50 gêneros e 350 espécies. São plantas lenhosas, arbustivas ou arbóreas e também trepadeiras ^{11,12}.

Ipê é a designação aplicada, da Bahia para o sul, a espécies do gênero *Tabebuia* providas de cerne pesado e escuro, duríssimo e imputrescível; *pau-d'arco* é o nome dado a eles da Amazônia à Bahia. Tais madeiras mostram-se pardo-oliváceas ou pardo-acastanhado-escuras, com reflexo esverdeado, lisas e de aspecto oleoso; como a peroba-de-campos, sempre encerram lapachol, cristais que, sob ação dos álcalis (potassa, soda), assumem coloração intensamente vermelha. É difícil de serrar, servindo em construções pesadas e estruturas externas, pontes, dormentes, tacos de bilhar e soalho, bengalas, cangas, etc. Outras espécies de *Tabebuia* têm lenho mole e branco, sem lapachol.

É característico deste gênero, perder a folhagem quando da emissão das flores; e o fazem com tal profusão que os galhos desfolhados ficam inteiramente revestidos; ao longe, são manchas vivamente coloridas na paisagem. Poucas plantas podem competir, em magnificência, com um ipê

florido. Após a floração, voltam às folhas digitadas a recobrir os ramos, enquanto os frutos prosseguem no desenvolvimento. As mais encontradas sob cultivo são: *Tabebuia heptaphylla* (Vell.) Tol., dotado de flores em panícula, roxas, róseas ou lilases; *Tabebuia impetiginosa* (Mart.) Standl., cujas flores em corimbo têm a mesma cor; *Tabebuia caraíba* (Mart.) Bur., oriundo do cerrado, leva flores amarelas; *Tabebuia chrysotricha* (Mart.) Standl., conhecido como ipê tabaco, ainda com corolas lúteas, mas distinto pela pilosidade ferrugínea que o reveste; *Tabebuia vellozoi* Tol. (o eminente *T. longiflora* (Vell.) Bur. & K. Sch.), também com flores amarelas, porém, máximas e desprovido de pêlos. *Cybistax antisiphilitica* Mart. parece-se com a *Tabebuia* e o povo chama-a de ipê-mandioca; contudo, as suas flores são verdes ¹⁰.

2.4 Espécie *Tabebuia heptaphylla*

Na botânica, a árvore *Tabebuia heptaphylla* é taxonomicamente classificada como apresentado na Tabela 01 ¹³.

Tabela 01: Classificação taxonômica da *Tabebuia heptaphylla*

Reino	Plantae
Filo	Angiosperma
Classe	Dicotiledônea
Ordem	Tubiflorae
Família	Bignoniaceae
Gênero	<i>Tabebuia</i>
Espécie	<i>heptaphylla</i>

A *Tabebuia heptaphylla* (Figura 01) possui uma série de nomes populares como: ipê, ipê roxo, ipê-roxo-de-sete-folhas, ipê preto, ipê rosa e pau-d'arco-roxo ¹⁴.

É uma árvore de 10-20 m de altura, com tronco roliço e casca acinzentada; ramos novos distintamente quadrangulares e cobertos de pêlos miúdos; folhas digitadas com cinco ou sete folíolos peciolados ¹⁵; folíolos glabros, membranáceos, de 5-14 cm de comprimento por 3-6 cm de largura.

Floresce durante os meses de julho a setembro com a planta totalmente despida de folhagem. A frutificação verifica-se nos meses de setembro até início de outubro.

A ocorrência desta árvore é principalmente no sul da Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo, grande parte na Mata Atlântica; é típica de regiões tropicais ¹⁴.

As folhas da *Tabebuia heptaphylla* são popularmente empregadas no caso de úlceras gástricas e duodenais e o chá da entrecasca é muito utilizado contra gripes. O ipê-roxo também é indicado no tratamento de gastrite, estomatite, bronquite e asma ¹⁶.



Figura 01: Folhas, flores, sementes e tronco da *Tabebuia heptaphylla*

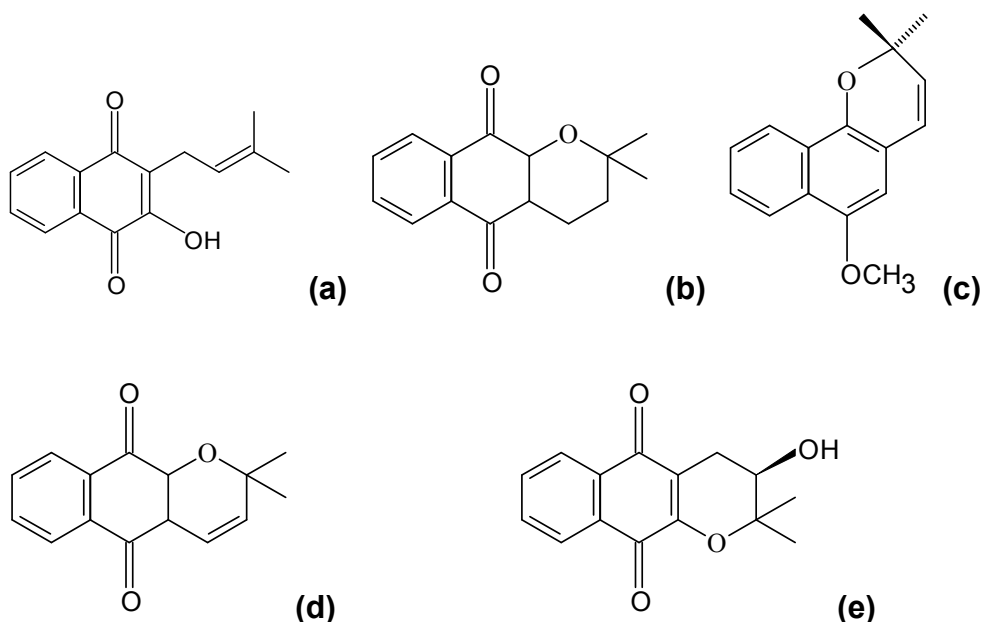
De acordo com a literatura, a *Tabebuia heptaphylla* é caracterizada fitoquimicamente pela presença de quinonas, naftoquinonas, flavonóides e iridóides.

Na década de 1960 desencadeou-se em todo o Brasil uma psicose decorrente de uma fama subitamente propagada, que atribuía ao Ipê-roxo propriedades curativas do câncer. Milhares de exemplares desta árvore foram, na época, inescrupulosamente despojados de sua casca e com isto condenados á morte, já que tal operação implicava na remoção do tecido cambial. Uma averiguação criteriosa apurou a total improcedência da crença popular. No entanto, uma curiosa coincidência localiza no cerne dos ipês (não na casca), uma substância – lapachol – que revela uma série de propriedades

farmacológicas das mais interessantes, entre elas, também, um efeito inibidor sobre o crescimento de tumores malignos. Ao mesmo tempo reduz ao que se indica, a dor e com isso levanta o ânimo dos pacientes. Embora não sendo um agente curativo, tais propriedades lhe valeram alguma aplicação clínica ¹⁰.

Os extratos do lenho de várias espécies de *Tabebuia* contêm, sobretudo, os compostos representados na Figura 02: lapachol **(a)** e desidro- α -lapachona **(d)**, lapachenol **(c)**, α -lapachona **(b)**, Rhinacantina A **(e)**, Sternocarpona B **(f)**, Stenocarpoquinona A **(h)**, Avicequinona A **(g)** e as lignanas secoisolariciresinol **(i)** e ciclooolivil **(j)**, enquanto os extratos das cascas contêm apenas traços dessas substâncias e teores maiores de furonaftoquinonas citotóxicas ^{17,18}.

O lapachol apresentou atividade anti-tumoral *in vitro* e chegou a ser testado clinicamente pelo NCI (National *Câncer Institute*, EUA). As investigações foram suspensas devidas á baixa biodisponibilidade da substância, que tornava necessário o uso de altas doses para atingir concentrações terapêuticas no plasma. Essas doses implicavam efeitos tóxicos, entre os quais o prolongamento do tempo de protrombima, sendo esse efeito anticoagulante devido possivelmente á similaridade estrutural do lapachol com a vitamina K ¹⁷.



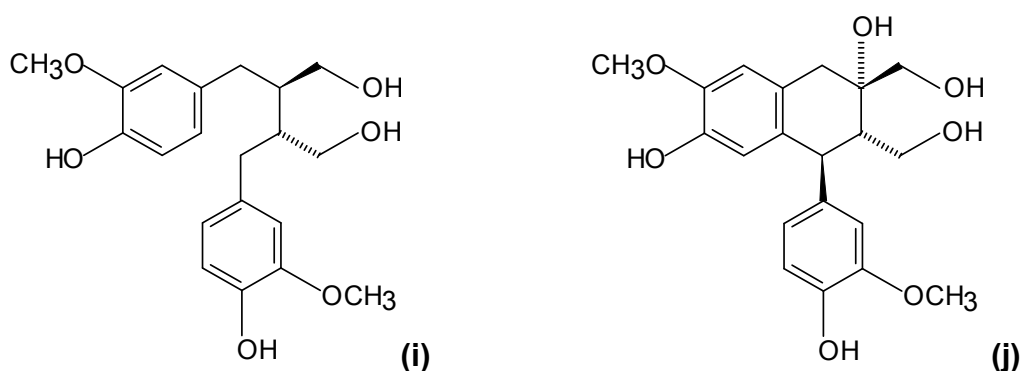
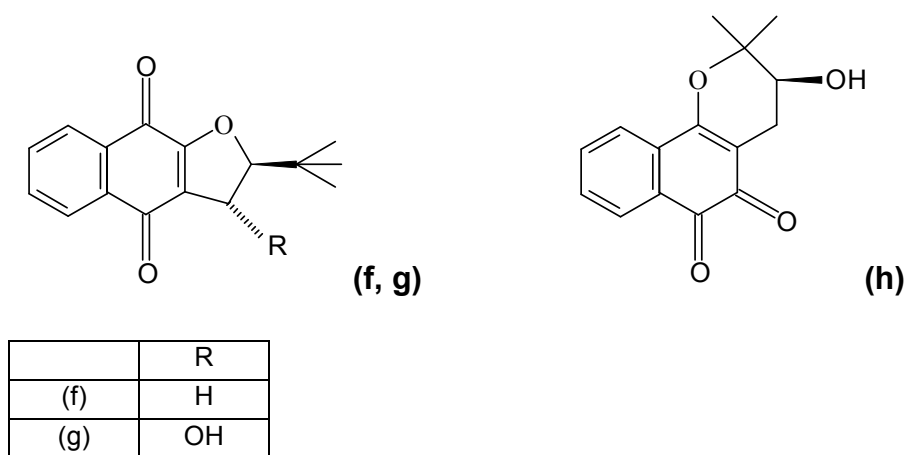


Figura 02: Compostos presentes em espécies do gênero *Tabebuia*.

As atividades biológicas relatam que o lapachol e seus derivados têm grande eficiência para os efeitos tripanocidas e moluscicidas.

O lapachol manifesta atividade fraca contra a forma amastigota do parasita *Leishmania donovani* que ocorre nos macrófagos peritoneais dos camundongos, de acordo com Schmeda-Hirschmann e seus colaboradores (2003).

Outros estudos feitos por Schmeda-Hirschmann, mostraram que a α -e a β -lapachona são membros de uma nova classe inibitória do DNA topoisomerase II. A α -lapachona, em particular, pode ser considerada detentora de um potencial que leve ao desenvolvimento de novas drogas, cujo mecanismo de ação é diminuir o efeito desta enzima ¹⁸.

A atividade antimicrobiana é relatada por Machado e colaboradores (2003). A responsabilidade por essa atividade é atribuída as naftoquinonas,

com eficiência já demonstrada no tratamento de infecções causadas por *Staphylococcus aureus*, configurando uma boa escolha para o desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento de infecções bacterianas ¹⁹.

Segundo Bianco e colaboradores (1983), a *Tabebuia heptaphylla* contém uma fração glicosídica de 0,9 a 1,0%. O composto mais polar desta fração foi encontrado como sendo o iridóide glicosilado C-6 epímero do monomellitosídeo (5- β -hidroxiaucubina). Isto é notável, já que estes compostos, a aucubina e o monomellitosídeo, tinham sido encontrados apenas em plantas típicas da zona temperada ²⁰.

Outros iridóides glicosilados (Figura 03) também foram isolados depois deste como: 6-O-*p*-OH-benzoil-*epi*-monomellitosídeo (**4**), 6-O-*p*-metoxi-benzoil-*epi*-monomellitosídeo, 6-O-*p*-OH-benzoil-ajugol (**2a**), 6-O-*p*-metoxibenzoil-ajugol (**2b**), 6-O-*p*-3,4-dimetoxibenzoil-ajugol (**2c**) e 6-O-*p*-OH-benzoil-6-*epi*-aucubina (**3**). ^{21,22}

Garcez e colaboradores (2007) recentemente relataram a obtenção de novos constituintes (Figura 03) nas cascas do caule de *Tabebuia heptaphylla*. O triterpenoide 3 β ,6 β ,21 β -trihidroxiolen-12-eno (**5**), assim como o iridóide 8 α -metil-8 β -hidróxi-6 β -(3',4'-dimetóxi)benzoilóxi-1 α ,3 α -dimetóxi-octaidro-ciclopenta[c]pirano sendo que existem poucos relatos sobre a ocorrência de triterpenos em espécies de *Tabebuia*. O glicosídeo feniletanóide verbascosídeo sendo descrito pela primeira vez no gênero *Tabebuia*, enquanto que o dialdeído ciclopentênico 2-formil-5-(3',4'-dimetoxibenzoilóxi)-3-metil-ciclopent-2-en-1-il (**6**) e o iridóide 8 α -metil-8 β -hidróxi-6 β -(4'-hidróxi) benzoilóxi-1 α ,3 α -dimetóxi-octaidro-ciclopenta[c]pirano foram relatados somente em *Tabebuia impetiginosa* e *Tabebuia avellanadae*, respectivamente. Três derivados do ácido benzóico (**1a**, **1b** e **1c**) também foram obtidos, além de esqualeno, sitosterol e sitostenona ²².

Baseado na informação de que a espécie possui derivados do ácido benzóico, o presente trabalho objetiva a obtenção destes e possíveis outros ácidos derivados do ácido benzóico agregando assim informações a respeito da composição fitoquímica da espécie.

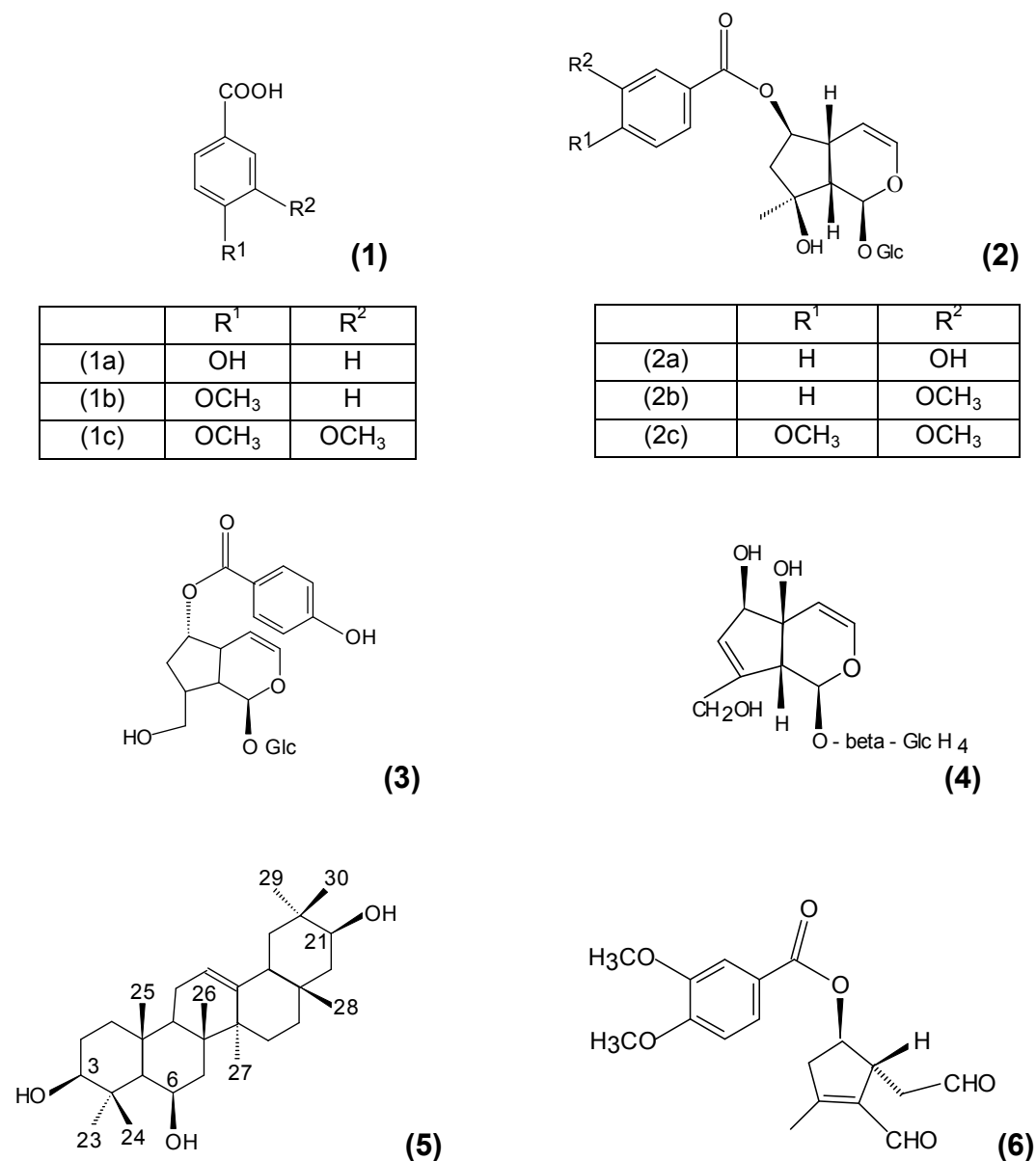


Figura 03: Compostos presentes na *Tabebuia heptaphylla*.

A figura 03 apresenta a estrutura de alguns compostos já isolados da *T. heptaphylla*, como **(1)** Derivados do ácido benzóico respectivamente, **(1a)** ácido *p*-hidroxibenzóico, **(1b)** ácido *p*-metoxibenzóico e **(1c)** ácido 3,4-dimetoxibenzóico. **(2)** iridóides glicosilados (2a) 6-O-*p*-OH-benzoil-ajugol, (2b) 6-O-*p*-metoxibenzoil-ajugol e (2c) 6-O-*p*-3,4-dimetoxibenzoil-ajugol, **(3)** 6-O-*p*-OH-benzoil-6-*epi*-aucubina, **(4)** 6-O-*p*-OH-benzoil-*epi*-monomelittosídeo, **(5)** triterpenoide 3 β ,6 β ,21 β -triidroxiole-12-eno e o dialdeído ciclopentênico **(6)** 2-formil-5-(3',4'-dimetoxibenzoilóxi)-3-metil-ciclopent-2-em-1-il.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo central deste trabalho é o isolamento e identificação de ácidos derivados do ácido benzóico da espécie *Tabebuia heptaphylla* utilizando técnicas de extração ácido-base e cromatografia de adsorção.

3.2 Objetivos Específicos

- Fracionar o extrato bruto de *Tabebuia heptaphylla* utilizando extração por particionamento líquido-líquido em meio ácido e base;
- Isolar através de cromatografia em coluna de sílica gel, analisando através de cromatografia em camada delgada, ácidos derivados do ácido benzóico e demais compostos provenientes das extrações ácido-base;
- Avaliar o teor de fenólicos totais e potencial redutor para o extrato bruto e frações a fim de avaliar a eficiência das extrações desta classe de compostos;
- Analisar os compostos purificados através de suas propriedades físico-químicas e análises espectroscópicas de IV, RMN ^1H e RMN ^{13}C , a fim de identificar os compostos isolados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Substâncias utilizadas

Os solventes utilizados foram adquiridos de fontes comerciais e usados sem purificação prévia. As misturas de solventes foram feitas considerando proporção volume por volume (v/v) e devidamente recuperados para posterior reutilização.

Nos fracionamentos cromatográficos em coluna, utilizou-se sílica gel como superfície adsorvente, na granulometria de 0,063-0,200 mm. O sistema de eluentes utilizado foram misturas de n-hexano, acetato de etila e etanol com aumento gradual da polaridade (0 a 100% EtOH).

Para cromatografia em camada delgada (CCD) foram usadas cromatoplasmas de alumínio revestidas com gel de sílica 60 com 0,2 mm de espessura (Merc). Todas as placas cromatográficas foram visualizadas, primeiramente, com lâmpada de UV (comprimento de onda de 250 e 366 nm), com posterior revelação em sulfato de cério, seguido de aquecimento.

4.2 Equipamentos

Os pontos de fusão foram determinados em aparelho da Microquímica APF-301, sendo que não sofreram nenhum tipo de correção.

Para as leituras de absorbância foi utilizado o espectrofotômetro Perkin Elmer UV/VIS em comprimentos de onda a 725 nm e 720 nm, respectivamente para a determinação do teor de fenólicos totais e potencial redutor.

Os espectros de infravermelho foram obtidos em pastilhas de KBr anidro de grau espectroscópico e em filme sobre janela de NaCl, com leituras na região de 4000 a 400 cm^{-1} em espectrofotômetro Perkin Elmer FT 16PC.

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram obtidos em aparelho Varian, operando em 400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C . Os deslocamentos químicos foram medidos em valores adimensionais δ (ppm), utilizando tetrametilsilano como referencial interno. As áreas relativas dos picos foram

obtidas por integração eletrônica e suas multiplicidades descritas como: s (singleto), d (duplete), t (triplete) e m (multiplete).

4.3 Coleta e identificação da *Tabebuia heptaphylla*

As cascas da *Tabebuia heptaphylla* utilizadas neste estudo são providas da CHA-MEL IND. E COM. DE PROD. NATURAIS LTDA, localizada em Campo Largo, Paraná. O material foi coletado em março de 2006 e devidamente identificado sob o número de lote 4753 e posteriormente seco

4.4 Obtenção do extrato bruto da *T. heptaphylla*

Uma vez que a espécie estava em estudo pelo grupo, a obtenção do extrato bruto já havia sido realizada.

A obtenção do mesmo procedeu-se da seguinte forma: após a coleta e identificação, o material (5 kg de *T. heptaphylla*), foi macerado estaticamente por sete dias com etanol (95%) a temperatura ambiente, sendo, em seguida, filtrado e concentrado usando-se evaporador rotatório sob pressão reduzida, até 1/3 do seu volume inicial, de forma que o solvente evaporado durante o processo fosse recuperado, obtendo-se, assim, 919,18 g de extrato etanólico bruto (Figura 04).

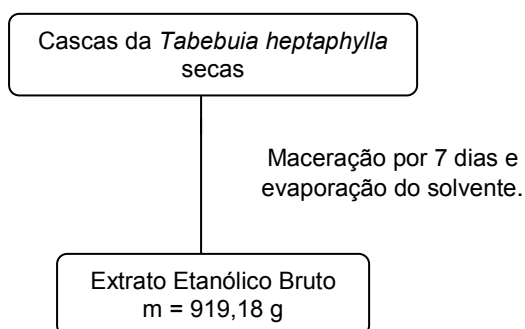


Figura 04: Fluxograma da obtenção do extrato bruto.

4.5 Extrações ácido-base

4.5.1 Parte I

Parte do extrato bruto (22,58 g) foi submetido a sucessivas extrações por AcOEt com variações no pH. Inicialmente a suspensão do EB em H₂O/EtOH teve seu pH elevado a 8 com uma solução de Na₂CO₃ 10%. Extrações com AcOEt foram realizadas sendo o solvente recuperado em evaporador rotatório e a massa obtida denominada Fr. pH ≈ 8.

A fração aquosa foi acidificada a pH aproximadamente 3 com uma solução de HCl 3,0 M. O produto das extrações com AcOEt após o mesmo ser evaporado e recuperado foi nomeado como Fr. pH ≈ 3. Por fim, a fração aquosa teve seu pH ajustado para 7 com Na₂CO₃ 10%. Novamente extrações com AcOEt foram feitas, o solvente recuperado e o produto da extração nomeado Fr. pH ≈ 7. A fração aquosa foi armazenada.

A Figura 05 representa as etapas realizadas e as respectivas frações obtidas.

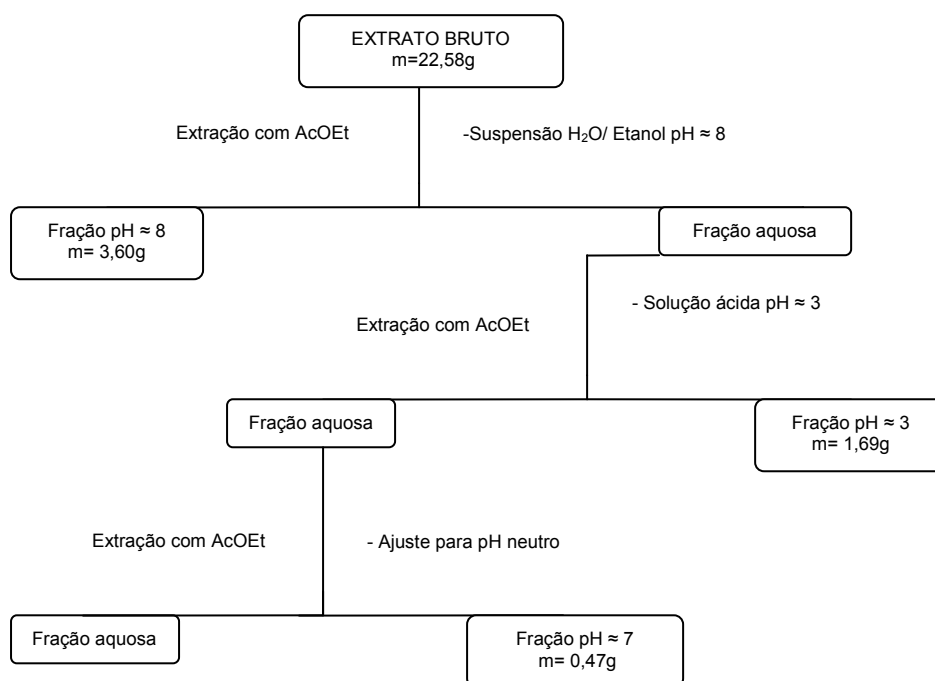


Figura 05: Fluxograma da sequência de extrações.

4.5.2 Parte II

Uma nova sequência de extrações com AcOEt mantendo-se o controle de pH foi realizada. Inicialmente a suspensão de H₂O/EtOH com 25,00 g de extrato bruto teve seu pH elevado a 11 com uma solução de NaOH 10%. Extrações com AcOEt foram realizadas sendo o solvente recuperado em evaporador rotatório e a massa final obtida denominada Fr. pH \approx 11.

A fração aquosa foi então acidificada a pH \approx 3 com uma solução de HCl 3,0 M. O produto das extrações com AcOEt após o mesmo ser evaporado e recuperado foi denominado como Fr. pH \approx 3. A fração aquosa teve seu pH ajustado para 7 com NaOH 10%. Novamente extrações com AcOEt foram feitas, o solvente recuperado e a massa resultante denominada Fr. pH \approx 7. Com a fração aquosa neutra restante procedeu-se a extração com n-butanol, o mesmo foi recuperado obtendo-se a Fr. n-butanol. A fração aquosa também foi evaporada a fim de se determinar a massa restante.

A Figura 06 representa as etapas realizadas e as frações obtidas.

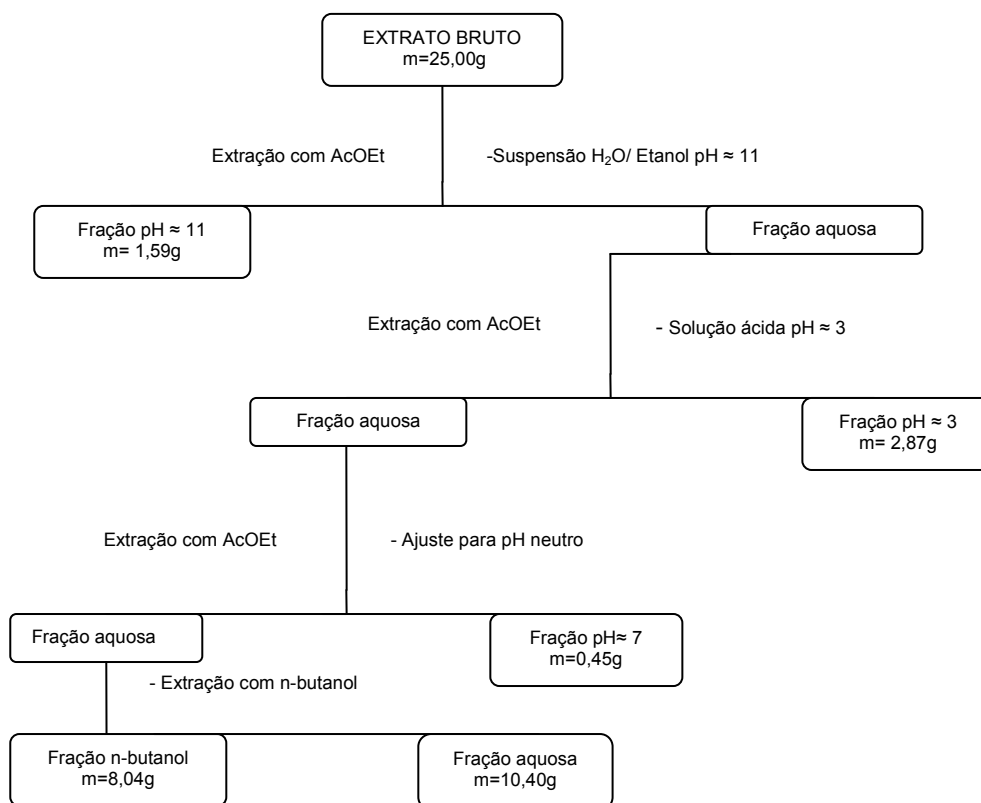


Figura 06: Fluxograma do primeiro procedimento de extrações.

Em uma segunda etapa novamente uma suspensão de H₂O/EtOH com 25,00 g de extrato bruto teve agora seu pH acidificado a 3 com uma solução de HCl 3M. Procedeu-se extrações com AcOEt o solvente foi recuperado em evaporador rotatório e a massa obtida denominada Fr. pH \approx 3.

O pH da fração aquosa foi elevado a aproximadamente 11 com uma solução de NaOH 10%. O produto das extrações com AcOEt após o mesmo ser evaporado e recuperado foi nomeado como Fr. pH \approx 11. A fração aquosa teve seu pH ajustado para 7 com HCl 3M. Novamente extrações com AcOEt foram realizadas, o solvente recuperado e a massa obtida nomeada Fr. pH \approx 7. Com a fração aquosa restante foi realizada uma extração com n-butanol, o mesmo foi evaporado e recuperado e o produto da extração denominado Fr. n-butanol. A fim de se determinar a massa restante, a fração aquosa também foi evaporada.

A Figura 07 representa as etapas realizadas e as respectivas frações obtidas.

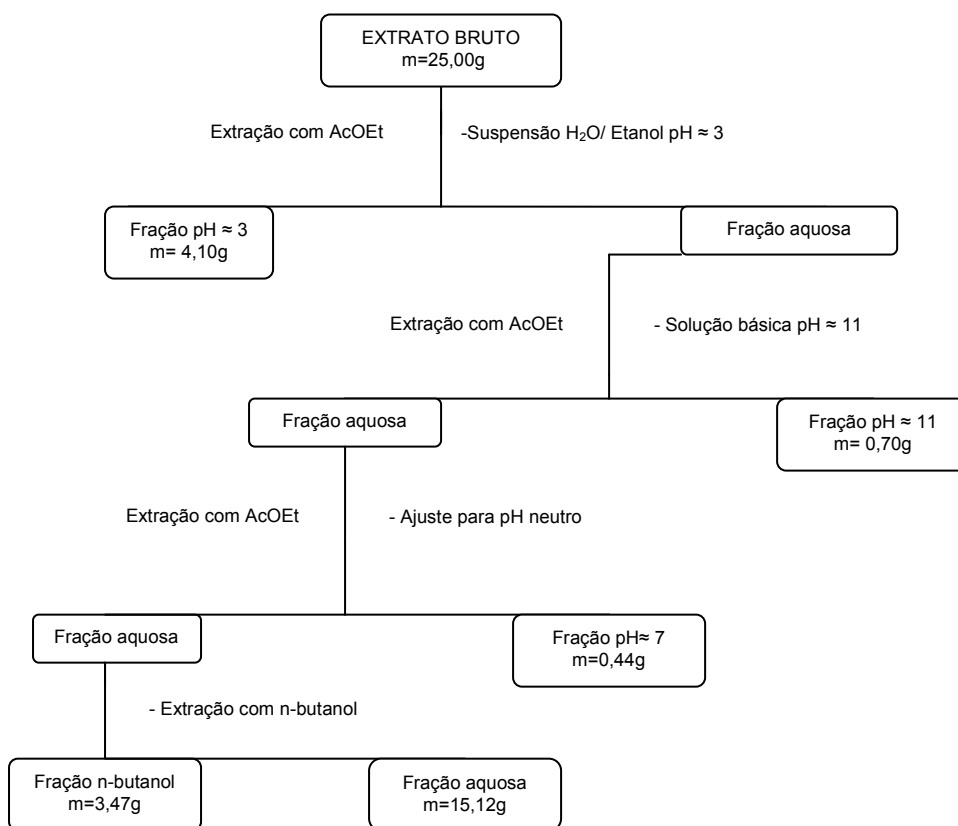


Figura 07: Fluxograma do segundo procedimento de extrações.

4.6 Fracionamentos

4.6.1 Parte I

Fracionamento da Fr. pH \approx 3:

A fração pH \approx 3 (1,69 g) foi submetida ao fracionamento cromatográfico em coluna (CC) empacotada com uma camada de 14,0 cm de altura por 4,5 cm de diâmetro de sílica gel, como fase estacionária. A amostra foi aplicada sob a forma de uma pastilha de sílica de 2,0 cm de altura ao topo desta coluna. Utilizou-se como eluente o sistema n-hexano/AcOEt/ EtOH com polaridade crescente (Tabela 2).

Tabela 02: Sistema de eluição empregado na cromatografia em pH \approx 3

n-hexano	AcOEt	EtOH	Frações
50	50	-	01-06
-	100	-	07-11
-	90	10	12-15
-	80	20	16-17
-	-	100	18-19

Deste fracionamento cromatográfico, foram obtidas 19 frações de 100 mL, as quais foram analisadas por CCD. As frações que apresentaram semelhança em seus perfis cromatográficos foram, então, reunidas.

Com a reunião das frações que apresentaram R_f semelhante, restaram cinco frações: 01-02, 03-04, 05-07, 06, 08-19.

Após a reunião das frações 01-02, procedeu-se a purificação por recristalização em n-hexano, resultando na obtenção de um composto cristalino (56,1 mg), denominado de **Ip-1**. O mesmo foi submetido às análises de ponto de fusão, infravermelho, RMN ¹H e RMN ¹³C.

O procedimento de purificação por recristalização em n-hexano das frações reunidas 03-04 resultou na obtenção de um composto cristalino (18,1 mg), nomeado **Ip-2**. O mesmo também foi submetido às análises de ponto de fusão, infravermelho, RMN ¹H e RMN ¹³C.

As frações restantes foram guardadas para estudos posteriores.

Fracionamento da Fr. pH \approx 8:

A fração pH \approx 8 (3,60 g) foi submetida ao fracionamento cromatográfico em coluna (CC) empacotada com uma camada de 14,0 cm de altura por 4,5 cm de diâmetro de sílica gel, como fase estacionária. A amostra foi aplicada sob a forma de uma pastilha de sílica de 3,0 cm de altura ao topo desta coluna. O sistema de eluentes com polaridade crescente entre n-hexano/AcOEt/ EtOH foi usado novamente (Tabela 3).

Tabela 03 Sistema de eluição empregado na cromatografia da Fr. pH \approx 8

n-hexano	AcOEt	EtOH	Frações
80	20	-	01-07
70	30	-	08-10
50	50	-	11-12
-	100	-	13-17
-	80	20	18-20
-	70	30	21-22
-	50	50	23
-	-	100	24

Com o fracionamento cromatográfico, foram obtidas 24 frações de 100 mL, as quais foram analisadas por CCD. As frações foram reunidas pela semelhança em seus perfis cromatográficos.

Com a reunião das frações com o R_f semelhante, restaram treze frações: 01, 02, 03-04, 05, 06, 07, 08, 09, 10-12, 14-15, 13-16-17, 18-22, 23 -24.

Da purificação da fr. 02 por recristalização em n-hexano obteve-se um sólido cristalino (69,4 mg), denominado **Ip-3** que foi submetido às análises de PF e IV.

Com o procedimento de purificação realizado nas fr. 03-04 reunidas obteve-se um sólido cristalino (14,3 mg), nomeado de **Ip-4** o qual foi submetido às análises de PF e IV.

Com a fr. 06 a purificação por recristalização foi realizada com AcOEt, resultando em um composto cristalino (9,0 mg), denominado **Ip-5**. O mesmo foi submetido também às análises de ponto de fusão e infravermelho.

Da purificação por recristalização com acetona das fr. 14-15 reunidas um composto amorfo foi obtido, contudo a quantidade deste composto não foi

suficiente para que alguma análise fosse realizada. As demais frações foram armazenadas para maiores estudos.

4.6.2 Parte II

Fracionamento da Fr. pH \approx 3 1º Procedimento:

A fração pH \approx 3 (2,57 g) foi submetida ao fracionamento cromatográfico em coluna (CC) empacotada com uma camada de 14,0 cm de altura por 4,5 cm de diâmetro de sílica gel, como fase estacionária. Na forma de uma pastilha de sílica de 3,0 cm de altura a amostra foi aplicada ao topo desta coluna. Mais uma vez como eluente foi utilizado o sistema n-hexano/AcOEt/ EtOH com polaridade crescente (Tabela 4).

Tabela 04: Sistema de eluição empregado na cromatografia em pH \approx 3
1ºProcedimento

n-hexano	AcOEt	EtOH	Frações
80	20	-	01-02
70	30	-	03-05
60	40	-	06
50	50	-	07
40	60	-	08-09
30	70	-	10-11
10	90	-	12-13
-	100	-	14-15
-	75	25	16-17
-	-	100	18

O fracionamento cromatográfico resultou na obtenção de 18 frações de 100 mL, as quais foram analisadas por CCD. De acordo com a semelhança em seus perfis cromatográficos, as frações foram reunidas.

Com a reunião das frações com o R_f semelhante, restaram oito frações: 01-02, 03, 04, 05-07, 12-13, 14-15, 16-17 e 18.

Da purificação por recristalização da fr. 01-02 com n-hexano obteve-se um sólido cristalino (68,4 mg) chamado de **Ip-6** que foi submetido às análises de PF e IV.

O procedimento de purificação por recristalização com n-hexano realizado na fr. 03 obteve-se um sólido cristalino (8,3 mg) **Ip-7** o qual foi submetido às análises PF e IV.

Com a purificação por recristalização alguns compostos foram obtidos, no entanto a quantidade por estes compostos não foi suficiente para que alguma análise fosse realizada e as frações restantes foram separadas para mais estudos.

Fracionamento da Fr. pH \approx 3 2ª Procedimento:

A fração pH \approx 3 (3,85 g) foi submetida ao fracionamento cromatográfico em coluna (CC) empacotada com uma camada de 14,0 cm de altura por 4,5 cm de diâmetro de sílica gel, como fase estacionária. A amostra foi aplicada sob a forma de uma pastilha de sílica de 3,0 cm e altura ao topo desta coluna. Como eluente utilizou-se o sistema n-hexano/AcOEt/ EtOH com polaridade crescente (Tabela 05).

Tabela 05: Sistema de eluição empregado na cromatografia em pH \approx 3
2ºProcedimento

n-hexano	AcOEt	EtOH	Frações
90	10	-	01-04
80	20	-	05-09
70	30	-	10-11
60	40	-	12-13
50	50	-	14-15
40	60	-	16-17
30	70	-	18-19
10	90	-	20-21
-	100	-	22-23
-	75	25	24-25
-	-	100	26

Foram obtidas 26 frações de 100 mL com o procedimento cromatográfico, as quais foram analisadas por CCD. Pela semelhança em seus perfis cromatográficos, as frações foram reunidas.

Com a reunião das frações com o Rf semelhante, restaram quatorze frações: 01, 02, 03, 04, 05, 07-09, 10-15, 16-17, 18-19, 20-21, 22, 23, 24-25 e 26.

Da purificação da fr. 03, denominado **lp-8**, por recristalização com n-hexano obteve-se um sólido amorfo (9,4 mg) que foi submetido às análises de PF, IV, RMN ^1H e RMN ^{13}C .

Com o procedimento de purificação por recristalização com n-hexano realizado na fr. 04 obteve-se um sólido cristalino (94,3 mg) denominado **lp-9** o qual foi submetido às análises de PF e IV.

Da purificação da fr.23 por recristalização com AcOEt um composto amorfo foi obtido, contudo a quantidade deste composto não foi suficiente para que alguma análise fosse realizada.

Novamente com o procedimento de purificação por recristalização alguns compostos foram obtidos, contudo a quantidade dos mesmos não foi suficiente para que alguma análise fosse realizada e todas as frações foram separadas para estudos posteriores.

4.7 Testes antioxidantes

4.7.1 Determinação do teor de fenólicos totais

Para a determinação do teor de fenólicos totais utilizou-se o método descrito por Anagnostopoulou e colaboradores (2006) através do reativo de Folin-ciocalteau ²³.

A 0,5 mL de uma solução da amostra (extrato e frações na concentração de 1000 ppm, diluídos em etanol), foram adicionados 5,0 mL de água destilada e 0,25 mL do reativo de Folin-ciocalteau. Adicionou-se 1,0 mL da solução saturada de Na_2CO_3 após 3 min, agitou-se e a solução foi deixada em repouso por 1 hora. As absorbâncias das soluções foram determinadas em espectrofotômetro a 725 nm. Uma solução preparada conforme descrito acima, porém, sem a presença da solução amostra foi utilizada como branco. O indicativo da presença de fenólicos no extrato ou fração testada é indicado

aparecimento de uma cor azul-escuro. A curva de calibração foi construída com soluções padrão de ácido gálico nas concentrações de 25 a 500 mg/mL, diluído em metanol, para comparação (Figura 08).

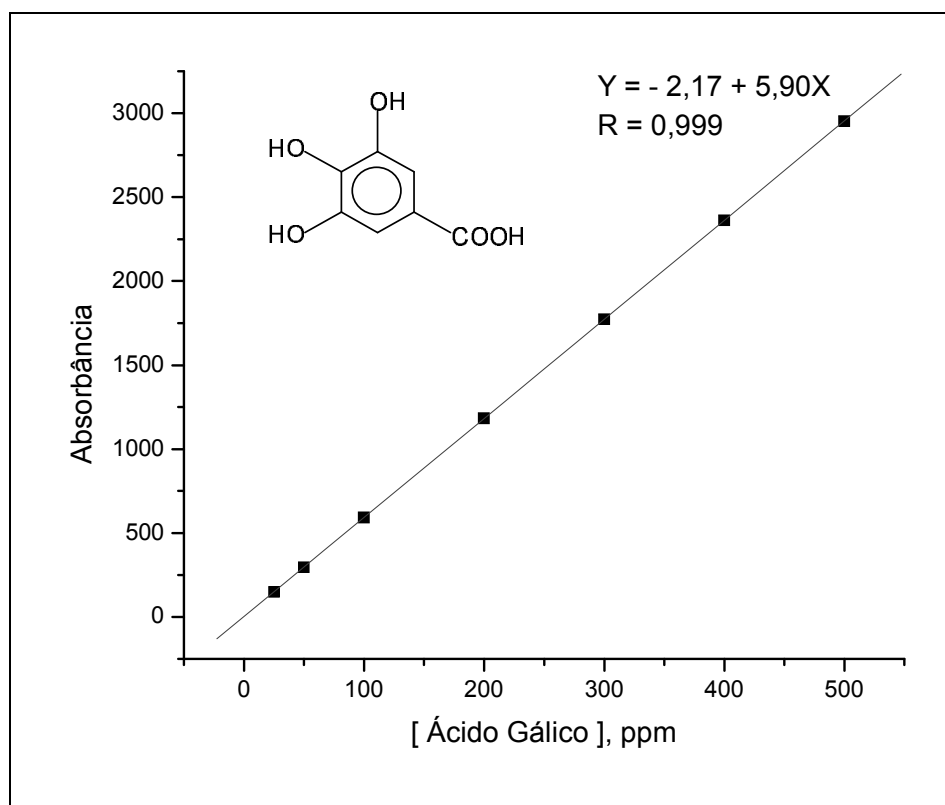


Figura 08: Curva de calibração com ácido gálico para conteúdo de fenólicos.

4.7.2 Determinação do potencial redutor

Para a análise da atividade antioxidante através da determinação do potencial redutor fez-se um ensaio baseado no método de Price e Butler, proposto por Waterman e Mole (1994), com algumas adaptações²⁴.

A 100 μ L das amostras (extrato bruto e frações na concentração de 1000 ppm) foram adicionados 8,5 mL de água deionizada. Adicionou-se então 1,0 mL da solução de FeCl_3 0,1 M, e após 3 minutos, 1,0 mL da solução de ferricianeto de potássio 0,08 M, e misturou-se. As leituras foram realizadas

após 15 min em espectrofotômetro a 720 nm. O aparecimento da cor azul da Prússia é indicativo de potencial redutor. A análise foi feita em duplicata. Uma solução preparada conforme o procedimento descrito acima, sem a adição da amostra, foi usada como branco. A curva de calibração foi obtida utilizando soluções padrões de ácido ascórbico (Figura 09). O potencial redutor das amostras foi expresso em mg de ácido ascórbico por g de amostra.

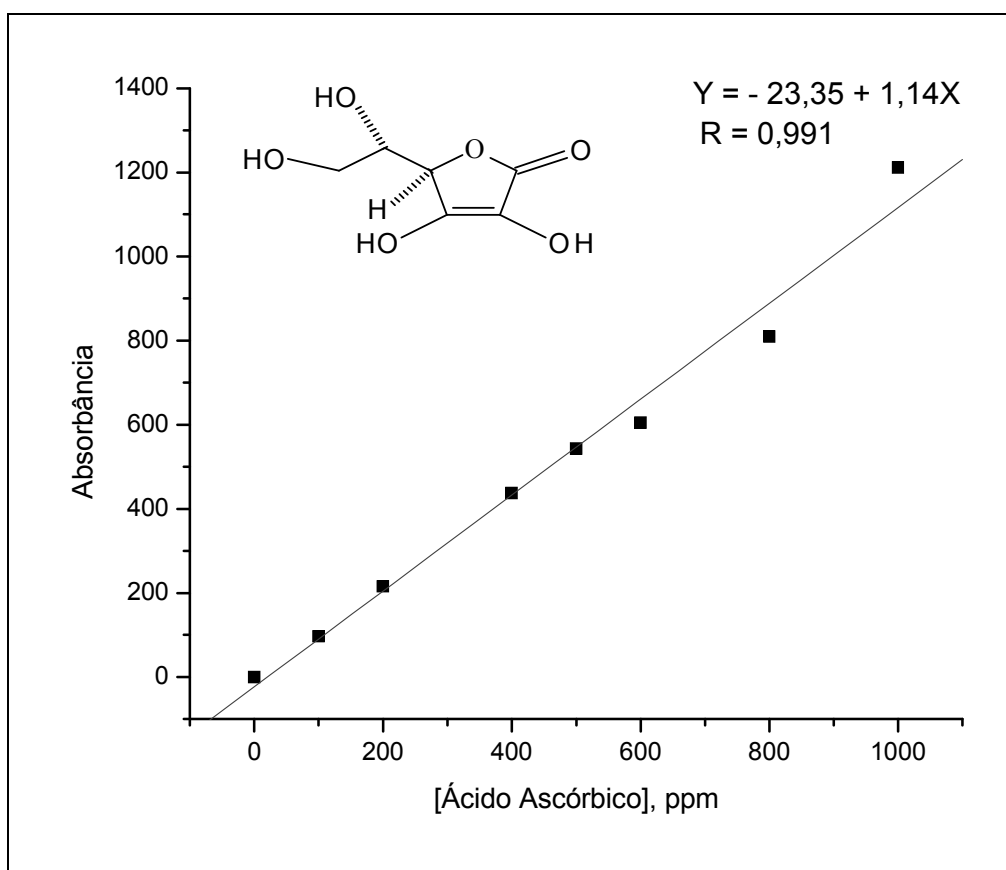


Figura 09: Curva de calibração com ácido ascórbico para conteúdo de fenólicos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extrato

Após a concentração do extrato a massa obtida para o extrato hidroalcoólico foi de 919,18 g, indicando, desta forma 18,38% de rendimento.

5.2 Parte I

Após a concentração dos extratos o rendimento obtido para a fração a pH básico foi de 3,60 g (15,94%), para a fração ácida de 1,68 g (7,48%) e para pH neutro de 0,47 g (2,08%).

Os compostos obtidos foram comparados por CCD com padrões certificados por análises de RMN e submetidos às análises de PF, IV, RMN ^1H e RMN ^{13}C , indicando a obtenção de derivados do ácido benzóico os quais foram identificados como descrito na secção 5.2.1 e 5.2.2.

Os ácidos Anísico (Figura 10) e Verátrico (Figura 11), que possuem respectivamente $\text{pka}=4,48$ ²⁵ e $\text{pka}=4,44$ ²⁶ foram extraídos das soluções ácidas onde os mesmos se encontram na forma molecular e consequentemente mais solúveis em solventes orgânicos. Sua presença na fração levemente básica ($\text{pH} \approx 8$) pode ser explicada por sua parcial solubilidade em solventes orgânicos, mesmo na forma ionizada, pela perspectiva dos mesmos estarem em grande quantidade na espécie e não estarem completamente desprotonados a $\text{pH} \approx 8$. Além do que os grupos metoxilas ao aumentarem a lipofilicidade destes compostos causam uma diminuição da solubilidade em água.

5.2.1 Obtenção e caracterização do Ácido Anísico

A comparação por CCD dos compostos isolados com os compostos padrões indicou a obtenção do ácido p-metoxibenzóico em **Ip-1** proveniente da extração ácida, **Ip-3** e **Ip-4** referentes à extração em pH \approx 8.

Na análise dos pontos de fusão são observados valores bastante semelhantes e próximos ao valor obtido na literatura para o Ácido Anísico que é de 182,0-185,0 °C, respectivamente 181,8-184,5 °C para **Ip-1**, 182,7-184,6 °C para **Ip-3** e 183,4-184,5 °C para **Ip-4**.

No espectro de infravermelho do **Ip-1** (Anexo 01) observa-se uma banda de absorção em 3447 cm^{-1} dentro da região de estiramento de ligações O-H e pode ser explicado pela presença de alguma umidade na amostra. A presença da absorção de baixa intensidade em 2985 cm^{-1} indica a existência de estiramento de ligações C-H de carbono sp^3 que é atribuído ao grupo CH_3 da metoxila, visto que esta é uma região característica de deformações axiais deste tipo de ligação. A absorção dos grupos OH de carboxila, devido fazerem fortes interações de Lig. H intermoleculares, pode ser observado no aumento da linha de base na região de $2300\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$. Na região de absorção das carbonilas, observa-se uma banda intensa em 1685 cm^{-1} que é característica de ácidos carboxílicos conjugados e em 1265 cm^{-1} observa-se a presença de estiramento de ligações C-O. Os espectros de infravermelho do **Ip-3** e **Ip-4** (Anexos 02 e 03) são idênticos ao do **Ip-1** mostrando as mesmas bandas características.

O espectro de RMN ^1H do **Ip-1** (400 MHz, acetona deuterada) (Anexo 04) apresenta três sinais para sete hidrogênios na proporção 3:2:2. Um par de dupletos centrados em 7,99 ppm (H-2 e H-6) e 7,02 ppm (H-3 e H-5) com integração para 2H cada e constante de acoplamento $J=8\text{ Hz}$ que pelo deslocamento químico e valor da constante de acoplamento indicam a presença de dois hidrogênios ligados a carbonos sp^2 aromáticos *orto* correlacionados. Este perfil indica a presença de um composto aromático *p*-dissubstituído. O terceiro sinal aparece em 3,88 ppm na forma de um singleto com integração para 3H indicando hidrogênios ligados a carbono sp^3 oxigenado o qual foi atribuído a uma metoxila.

O espectro de RMN ^{13}C do **Ip-1** (100 MHz, acetona deuterada) (Anexo 04) apresentou cinco sinais dos quais um é de carbono sp^3 , um de carbonila e quatro de carbono sp^2 . O sinal em 187,00 ppm é referente à carbonila de ácido. O sinal que aparece em 163,73 ppm, por se altamente desprotegido, refere-se a um carbono aromático oxigenado, sendo, portanto atribuído ao carbono C-4 ligado à metoxila. O sinal em 131,81 ppm é relativo a dois carbonos sp^2 referentes aos carbonos 2 e 6. O sinal em 113,85 ppm indica a presença de dois carbonos sp^2 atribuídos aos carbonos 3 e 5. Um terceiro tipo de carbono sp^2 referente a um carbono aparece absorvendo em 123,04 ppm sendo atribuído ao C-1 que está ligado a carbonila. O sinal em 55,21 ppm indica a presença de um carbono sp^3 de metoxila.

De acordo com a comparação por CCD com padrões e os resultados obtidos das análises físicas e espectroscópicas realizadas, o Ácido Anísico foi isolado e caracterizado nas respectivas frações, como já descrito na literatura para a espécie.

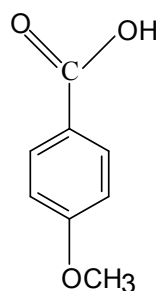


Figura 10: Estrutura química do Ácido Anísico

5.2.2 Obtenção e caracterização do Ácido Verátrico

A comparação dos compostos isolados por CCD com os compostos padrões indicou a obtenção do ácido 3,4-dimetoxibenzóico em **Ip-2** referente à extração ácida e **Ip-5** da extração em $\text{pH} \approx 8$.

A análise dos pontos de fusão apresentou valores bastante semelhantes e próximos ao valor obtido na literatura para o Ácido Verátrico que é de 181,0-183,0 °C, respectivamente 180,3-181,7 °C para **Ip-2** e 177,4-179,7 °C para **Ip-5**.

A esta diferença obtida atribui-se provavelmente a presença de impurezas na amostra **Ip-5**.

O espectro de infravermelho do **Ip-2** (Anexo 05) assemelha-se ao do Ácido Anísico, mostra a absorção do grupo OH da carboxila na linha de base e a carbonila em 1679 cm^{-1} modelo característico para ácidos carboxílicos aromáticos. A presença da absorção em 2939 cm^{-1} de baixa intensidade indica a existência de estiramento de ligações C-H de carbono sp^3 que é atribuído ao grupo CH_3 da metoxila, visto que esta é uma região característica de deformações axiais deste tipo de ligação. A absorção em 1250 cm^{-1} indica a presença de estiramento de ligações C-O. O espectro de infravermelho do **Ip-5** (Anexo 06) é idêntico ao do **Ip-2** mostrando as mesmas bandas características.

O espectro de RMN ^1H do **Ip-2** (400 MHz, acetona deuterada) (Anexo 07) apresenta cinco sinais para nove hidrogênios na proporção 3:3:1:1:1. Um duplete centrado em 7,54 ppm com integração para 1H e constante de acoplamento $J=2\text{ Hz}$, indica a presença de um hidrogênio aromático **meta** correlacionado. Um duplete centrado em 7,04 ppm com integração para 1H e constante de acoplamento $J=8\text{ Hz}$ indicando a presença de um hidrogênio aromático **orto** correlacionado. E um duplo duplete centrado em 7,65 ppm com integração para 1H e constantes de acoplamento $J=8\text{ Hz}$ e 2 Hz indica a presença de um hidrogênio acoplado em **orto** e em **meta** com outros hidrogênios ligados a carbonos sp^2 aromáticos. Este perfil indica a presença de um composto aromático 1,3,4-trissubstituído. O quarto e quinto sinais aparecem na forma de dois singletes em 3,88 e 3,86 ppm com integração para 3H cada ligados a carbono sp^3 oxigenado e que foram atribuídos a duas metoxilas.

O espectro de RMN ^{13}C do **Ip-2** (100 MHz, acetona deuterada) (Anexo 07) apresenta nove sinais dos quais um é referente à carbonila, dois são carbonos sp^3 e seis são carbonos sp^2 . O sinal em 167,50 ppm é relativo à carbonila do ácido. Os sinais em 154,27 ppm e 149,83 ppm, mais desprotegidos, indicam a presença de carbonos sp^2 vicinais ligados aos oxigênios e que foram atribuídos aos carbonos C-4 e C-3 ligados às metoxilas. O sinal em 124,36 ppm é relativo ao carbono C-1 que está ligado ao carbono da carbonila. Aparecem em 113,17 ppm, 114,47 ppm, e 111,60 ppm sinais que correspondem a três carbonos sp^2 , atribuídos respectivamente a C-2, C-5 e C-6. Os sinais em 56,11 ppm e 56,04

ppm indicam a presença de dois carbonos sp^3 atribuídos à presença de duas metoxilas.

De acordo com a comparação em CCD e com os resultados obtidos das análises físicas e espectroscópicas, o Ácido Verátrico foi isolado e caracterizado nas respectivas frações, como já descrito na literatura para a espécie.

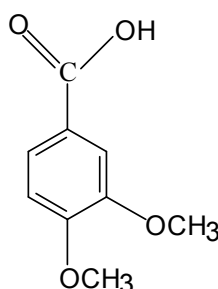


Figura 11: Estrutura química do Ácido Verátrico

5.3 Parte II

O primeiro procedimento de extrações desta etapa iniciado a pH básico teve o intuito de desprotonar as substâncias ácidas, diminuindo assim sua solubilidade em solvente orgânico e separá-la de substâncias neutras e alcalinas de baixa polaridade. Assim o rendimento foi de 1,59 g (6,35%) para a fração básica, 2,87 g (11,50%) para a ácida, 0,45 g (1,79%) para a neutra extraída com acetato de etila, 8,04 g (32,18%) para a fração neutra extraída com n-butanol e 10,40 g (41,58%) para a fração aquosa restante.

No segundo procedimento de extrações o qual foi iniciado com o pH ácido que pode aumentar a solubilidade de alguns compostos fenólicos facilitando sua extração ⁵. Assim o rendimento foi de 4,10 g (16,40%) para a fração ácida, 0,70 g (2,82%) para a básica, 0,44 g (1,78%) para a neutra extraída com acetato de etila, 3,47 g (13,90%) para a fração neutra extraída com n-butanol e 15,12 g (60,48%) para a fração aquosa restante.

Com o procedimento de CC para as frações ácidas, os ácidos Ânísico e Verátrico foram novamente isolados e identificados por comparação em CCD com os compostos padrões, análises de PF e IV.

O ácido p-metoxibenzóico (Figura 10) foi obtido nas frações **Ip-6** e **Ip-9**. Na análise dos pontos de fusão os valores obtidos assemelham-se e estão de acordo com o valor apresentado na literatura que é de 182,0-185,0 °C, respectivamente 181,9-184,0 °C para **Ip-6** e 184,8-185,3 °C para **Ip-9**. Nos espectros de infravermelho (Anexo 08 e 09) as bandas características discutidas na sessão 5.2.1, são observadas.

O ácido 3,4-dimetoxibenzóico (Figura 11) foi obtido na fração **Ip-7**. A análise do ponto de fusão apresentou o valor de 180,2-181,7 °C, o mesmo é bastante semelhante aos obtidos anteriormente e próximo ao valor obtido na literatura que é 181,0-183,0 °C. No espectro de infravermelho (Anexo 10) observam-se as bandas características para o ácido em questão discutidas na sessão 5.2.2.

5.3.1 Obtenção do β -Sitosterol e Stigmasterol

Na comparação por CCD do composto **Ip-8** com os padrões de derivados do ácido benzóico observou-se uma diferença significativa no Rf.

A análise do ponto de fusão forneceu um valor de 134,7-135,9 °C, bastante semelhante ao encontrado na literatura para os fito esteróis como o β -Sitosterol que é de 138-139 °C.

No espectro de infravermelho (Anexo 11) observa-se um perfil de absorções característico de compostos esteroidais, mostrando uma banda de absorção em 3435 cm^{-1} , dentro da região de estiramento de ligações O-H. A presença de um pico bastante intenso em 2936 cm^{-1} indica a existência de muitas ligações C-H, visto que esta é uma região característica de deformações axiais deste tipo de ligação. A ausência de bandas de carbonila e a observação de um perfil de absorções típicas de esteróides indicam que o composto **Ip-8** possui uma estrutura esteroidal.

Na análise do espectro de RMN ^1H (400 MHz, clorofórmio deuterado) (Anexo 12), também se observou um perfil típico de esteróis com uma grande quantidade de sinais na região de campo alto, entre 0,6 e 2,3 ppm. Estes sinais são encontrados em substâncias esteroidais e triterpênicas devido a grande quantidade de grupamentos CH_3 , CH_2 e CH alifáticos. O sinal em 5,36 ppm é característico de um hidrogênio de ligação dupla trissubstituída no anel "B" dos

esteróis. O multipeto na região de 3,5 ppm para um hidrogênio carbinólico caracteriza a presença do grupo hidroxila no carbono C-3. Os dois duplos dupletes centrados em 5,15 e 5,01 ppm indicam a presença de hidrôgenios ligados aos carbonos C-22 e C-23 da dupla ligação. Este perfil indica a obtenção de uma mistura de esteróis, estando o Stigmasterol em menor quantidade.

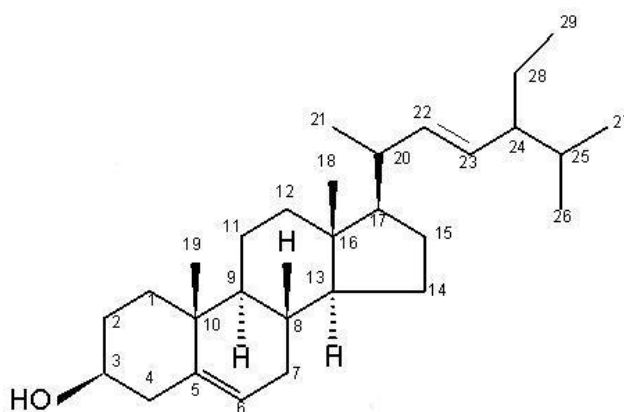


Figura 12: Estrutura química do Stigmasterol.

A Tabela 06 apresenta a comparação dos valores obtidos para a análise de RMN ^{13}C (Anexo 13) e os dados encontrados na literatura referentes ao β -Sitosterol, composto majoritário da amostra (Figura 13).

Tabela 06: Valores comparativos de RMN ^{13}C para Ip-8

Posição	δ_c (ppm) CDCl_3	
	Literatura ²⁷	Ip-8
1	37,2	37,48
2	31,6	31,89
3	71,8	72,04
4	42,2	42,53
5	140,7	140,97
6	121,7	121,95
7	31,8	32,14
8	31,8	32,14
9	50,0	50,35
10	36,4	36,73
11	21,0	21,31
12	39,7	39,99
13	42,3	42,53
14	56,7	56,99
15	24,3	24,54
16	28,2	28,48
17	55,9	56,27
18	11,8	12,09
19	19,4	19,64
20	36,1	36,38
21	18,7	19,01
22	33,8	34,16
23	25,9	26,27
24	45,7	46,05
25	29,0	28,48
26	19,8	19,64
27	19,0	19,01
28	23,0	23,29
29	11,9	12,21

A comparação dos dados de carbono 13 com os da literatura confirma a estrutura majoritariamente como sendo a do β -Sitosterol, como já descrito na literatura para a espécie.

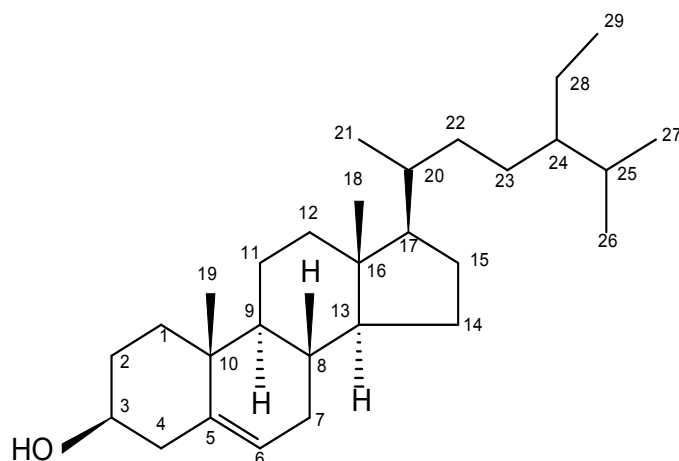


Figura 13: Estrutura química do β -Sitosterol

5.4 Testes antioxidantes

Os testes para determinação do teor de fenólicos totais e do potencial redutor foram realizados com o intuito de verificar a eficiência das extrações realizadas.

Os ácidos fosfotúngstico e fosfomolibdico compõem o reativo de Folin-ciocalteau que quando reduzidos pelos compostos fenólicos em meio alcalino, formam os respectivos óxidos de tungstênio e molibdênio de coloração azul esverdeado ²³. A observação de uma coloração intensa indica um maior conteúdo de fenólicos no extrato e/ou fração testada.

O poder redutor foi observado pela doação direta de elétrons na redução do ferricianeto de potássio ($\text{Fe}^{3+} (\text{CN}^-)_6$) a ferrocianeto de potássio ($\text{Fe}^{2+} (\text{CN}^-)_6$). O complexo azul da Prússia, $\text{Fe}_4^{3+} [\text{Fe}^{2+} (\text{CN}^-)_6]_3$, é formado como produto da adição de íons Fe^{3+} , proveniente de FeCl_3 , após a reação de redução, o mesmo foi quantificado por medida de absorvância a 720 nm. Os métodos baseados na redução do Fe^{3+} , que determinam o poder redutor são também utilizados para avaliação da atividade antioxidante. A capacidade de compostos fenólicos reduzirem o Fe^{3+} , com conseqüente formação de um complexo colorido com Fe^{2+} é avaliado por tais métodos ^{24,28}.

De acordo com a tabela 14 observa-se uma maior e regular quantidade de compostos fenólicos nas frações ácidas, o que pode ser justificado pelo pKa desta classe de compostos entre 8 e 12, e por condições ácidas favorecerem a solubilidade dos mesmos.

Tabela 07: Atividade antioxidante do EB e frações da *T. heptaphylla*.

Extrato/Fração	Fenólicos	Redutor
	mg ác. gálico /g extrato seco	mg ác.ásc /g extrato seco
EB	26,72 ± 1,95	86,71 ± 3,95
Fr. pH ≈ 3 (1ª)	63,08 ± 3,22	206,01 ± 0,44
Fr. pH ≈ 11 (1ª)	48,67 ± 0,68	201,19 ± 0,88
Fr. pH ≈ 7 (1ª)	47,06 ± 1,78	151,18 ± 0,00
Fr.n-butanol(1ª)	26,81 ± 0,85	64,78 ± 3,07
Fr. aquosa (1ª)	9,35 ± 1,02	77,94 ± 10,96
Fr. pH ≈ 3 (2ª)	63,25 ± 0,34	217,41 ± 3,95
Fr. pH ≈ 11 (2ª)	26,90 ± 0,42	105,13 ± 0,44
Fr. pH ≈ 7 (2ª)	26,56 ± 0,25	76,18 ± 6,58
Fr.n-butanol (2ª)	21,38 ± 0,34	60,40 ± 3,95
Fr. aquosa (2ª)	8,00 ± 0,50	23,12 ± 0,22

A primeira sequência de extrações, iniciada com pH básico, apresenta maiores quantidades de fenólicos nas frações seguintes indicando uma maior quantidade e distribuição dos mesmos.

O maior potencial redutor foi observado nas frações com maior concentração de fenólicos, estando de acordo com a grande atividade antioxidante atribuída a esta classe de compostos. As variações observadas entre a quantidade de fenólicos e o poder redutor em diferentes frações sugerem a presença de compostos com maior ou menor potencial antioxidante.

6 CONCLUSÃO

Uma vez que os objetivos do trabalho eram isolar, caracterizar e identificar derivados do ácido benzóico e demais compostos presentes na espécie *Tabebuia heptaphylla* é possível concluir que os mesmos foram alcançados.

O teor de fenólicos para o extrato bruto e frações e o respectivo poder redutor foram determinados indicando a influência das condições experimentais escolhidas.

Com a realização deste trabalho ficou comprovado que procedimentos cromatográficos simples e outras técnicas que avaliam as propriedades físicas, são de grande importância para a caracterização e identificação de compostos, principalmente daqueles que já são bastante difundidos na literatura, como foi o caso dos derivados do ácido benzóico e da mistura de β -Sitosterol e Stigmasterol.

Cabe ressaltar que deve ser incentivada a continuação dos estudos com as outras frações a fim de tornar a avaliação fitoquímica desta espécie mais rica em informações. Deve-se também investir na realização da avaliação das propriedades farmacológicas da *Tabebuia heptaphylla* em busca de suas potencialidades.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

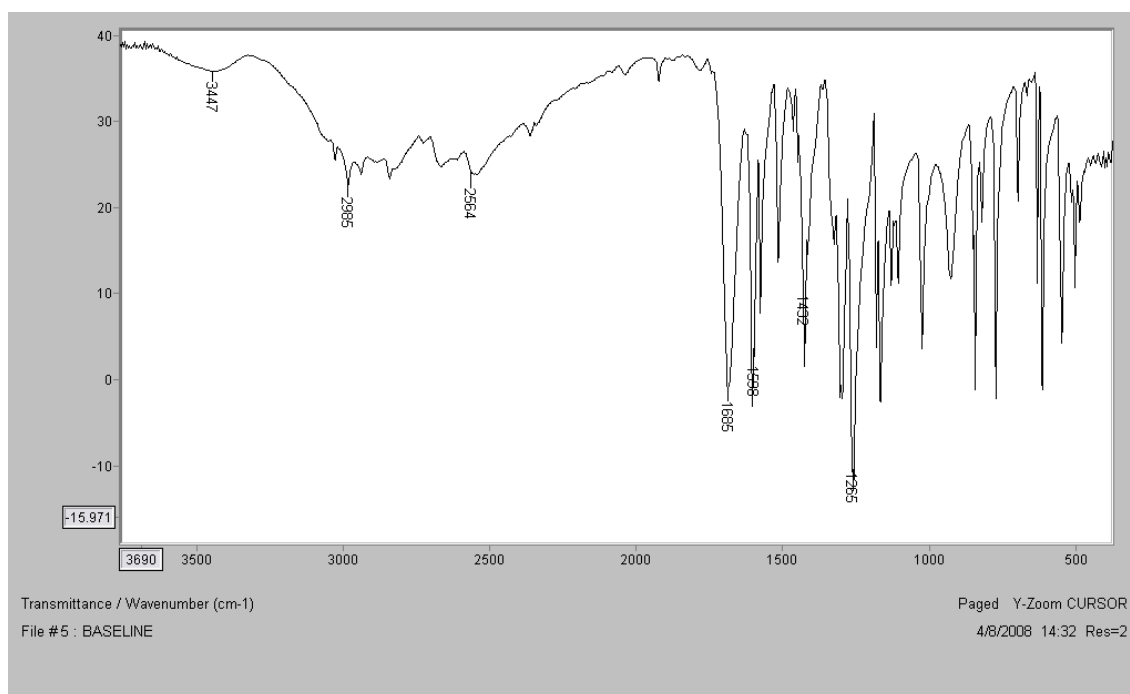
1. PINTO, A. C. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**. São Paulo, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.
2. SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia – da Planta ao Medicamento**. 2. Ed, Florianópolis/ Porto Alegre: Editora da UFSC/ Editora da UFRGS, 2000
3. <http://www.unb.br/iq/litmo/disciplinas/LQO-2006-1/Roteiros/Experimento%206.pdf>. Acessado em 26/09/2008.
4. MATOS, F. J. A. **Introdução a Fitoquímica Experimental**. Coleção Ciência, EUFC: Fortaleza, 1988.
5. BERTOLDI, M. C. Atividade antioxidante *in vitro* da fração fenólica da oleorresinas e do óleo essencial de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius Raddi*). 2006. 116 f. **Dissertação de mestrado** – Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, 2006.
6. ROBARDS, K. **Journal of Chromatography A**. 1000, 657-691, 2003.
7. SOUSA, C. M. DE M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**. V. 30, n. 2, Março/Abril 2007.
8. ATOUI, A. K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P.; **Food Chem.** 89, 27, 2005.
9. HASLAM, E.; **J. Nat. Prod.** 59, 205, 1996.
10. RIZZINI, C. T. **Botânica econômica brasileira**. São Paulo: EPU/EDUS, 1976.
11. JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 11. Ed. São Paulo: 1993.

- 12.SOUZA, V. C. LORENZI, H.; **Botânica Sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II, Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2005.
- 13.RAVEN, P. H; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 6. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan: 1996.
- 14.LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 1. ed Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 1998.
- 15.CRUZ, G L. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: Civilização Brasileira, 1979.
- 16.HIGA, T. C. Morfogênese e Conservação in vitro para *Tabebuia heptaphylla* (Vellozo) Toledo (Bignoniaceae). 2006. 154 f., **Dissertação de mestrado** – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.
- 17.OLIVEIRA, C. M. **Farmacognosia – da Planta ao Medicamento**. 2. Ed, Florianópolis/ Porto Alegre: Editora da UFSC/ Editora da UFRGS, 2000.
- 18.SCHMEDA-HISCHMANN, G.; PAPASTERGIOU, F.; **Journal of Biosciences**. 58c, 495-501, 2003.
- 19.MACHADO, T. B. et al. **International Journal of Antimicrobial Agents**. 21, 279-284, 2003.
- 20.BIANCO, A.; PASSACANTILLI, P.; POLIDORI, G.; NICOLETTI, M.; ALVES DE LIMA, R.; **Phytochemistry**. v. 22, n. 5, p. 1189 – 1191, 1983
- 21.LINO VON POSER, G.; SCHRIPSEMA, J.; HENRIQUES, A .T.; ROSENDAL, J. S. **Biochemical Systematics and Ecology**. 28, 351-366, 2000.

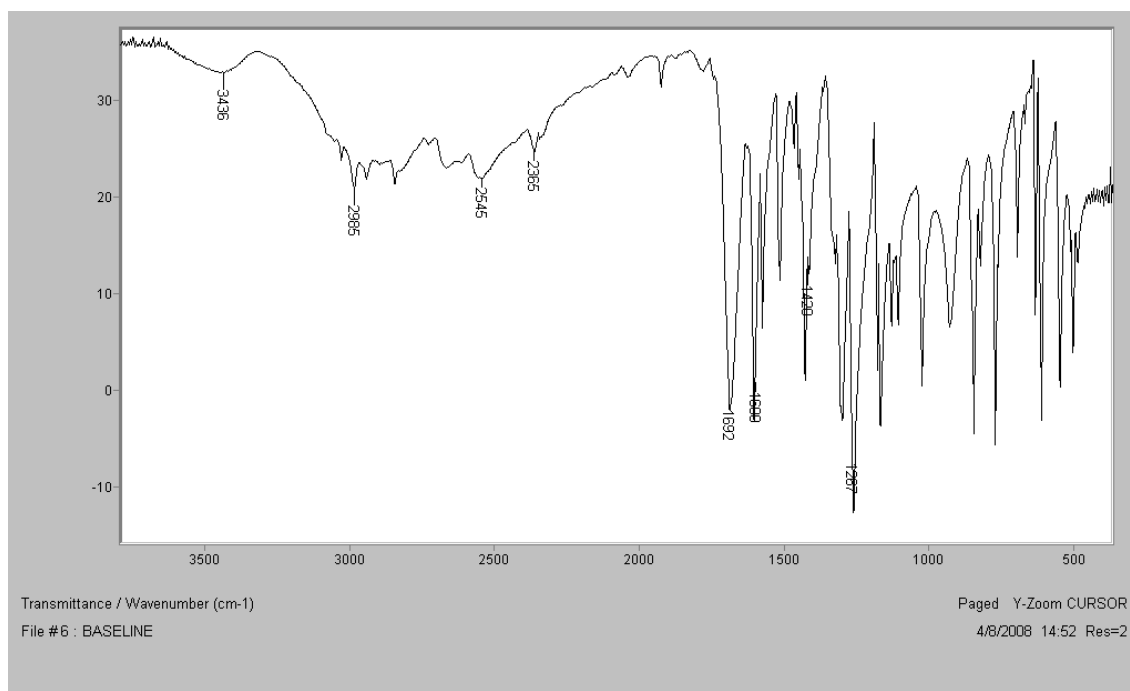
22. GARCEZ, F. R. et al. Novos constituintes químicos das cascas do caule de *Tabebuia heptaphylla*. **Química Nova**. São Paulo, v. 30, n. 8, 2007.
23. ANAGNOSTOPOULOU, M. A. et al. **Food Chemistry**, 94(1), 19-25, 2006.
24. WATERMAN, P. G.; MOLE, S., **Blackwell Scientific Publications**, 238, 1994.
25. BARRET, A. D.; DAVIES C. M.; SHAW N. P.; WAN. H. Q. **Journal of Chromatography A**. 697, 219-227, 1995.
26. RICHARD. D.; NÚÑEZ, D. L. M.; SCHWEICH, D. **Chemical Engineering Journal**. IN PRESS, 2008.
27. SCHUHR, A. C. et al. **Phytochemistry Reviews**, 2, 3-16, 2003.
28. ROGINSKY, V.; LISSI, E. A., **Food Chemistry**, 92, 235, 2005.
29. SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de composto orgânicos**. Editora LCT, 6ª edição, Rio de Janeiro, 2000.

8 ANEXOS

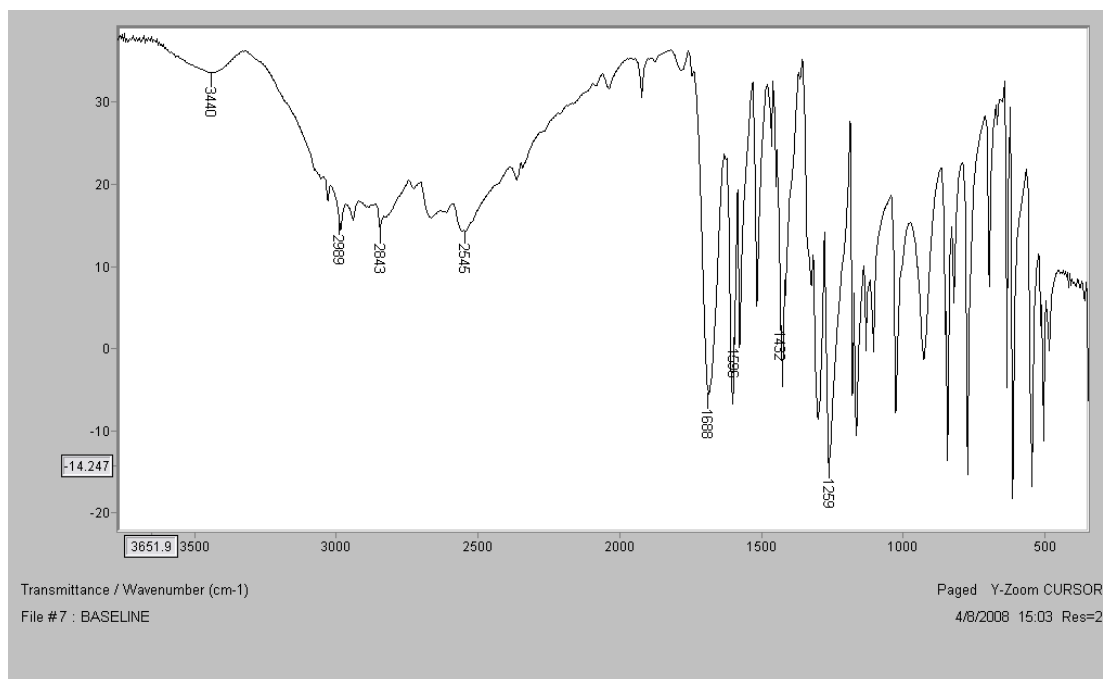
Anexo 01 - Espectro de Infravermelho (KBr) do Ip-1 (Ácido Anísico)



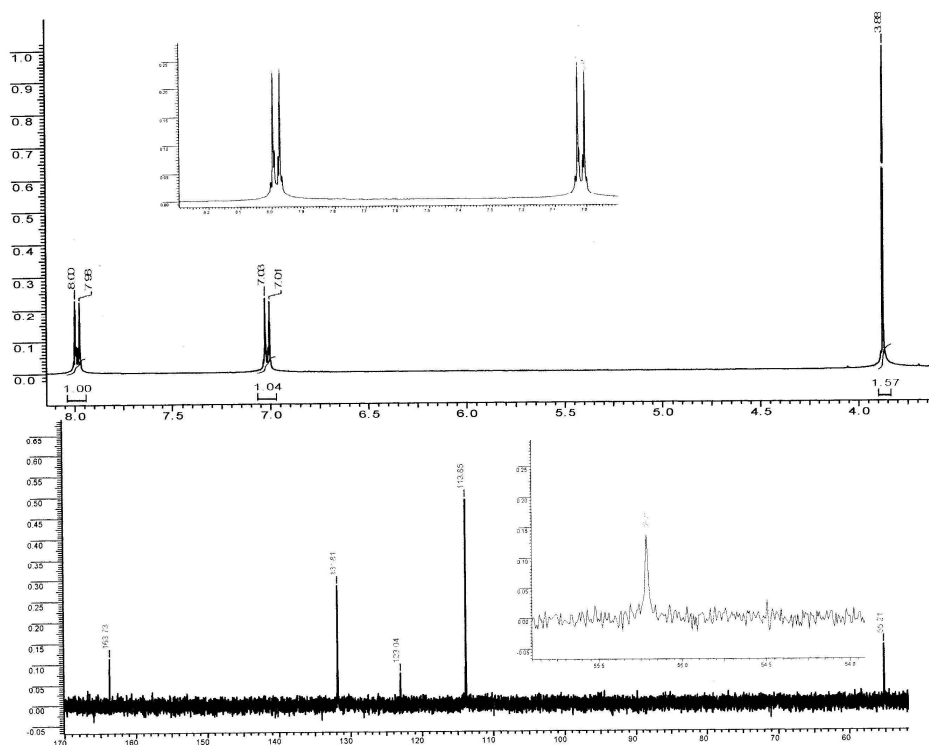
Anexo 02 - Espectro de Infravermelho (KBr) do Ip-3 (Ácido Anísico)



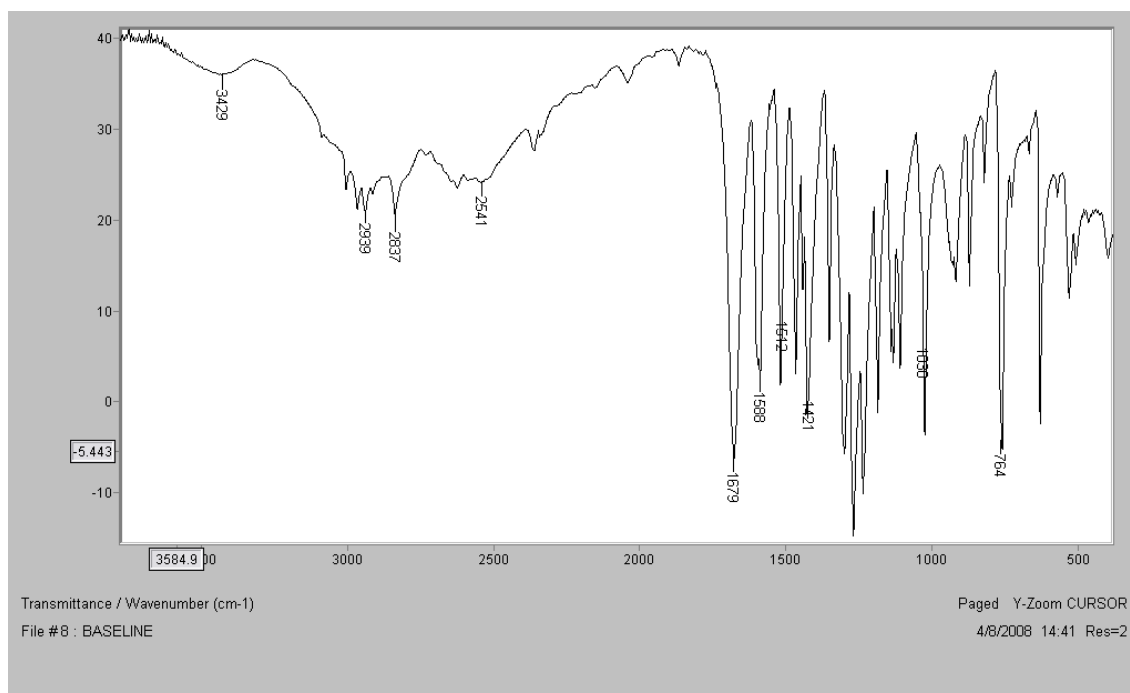
Anexo 03 - Espectro de Infravermelho (KBr) do Ip-4 (Ácido Anísico)



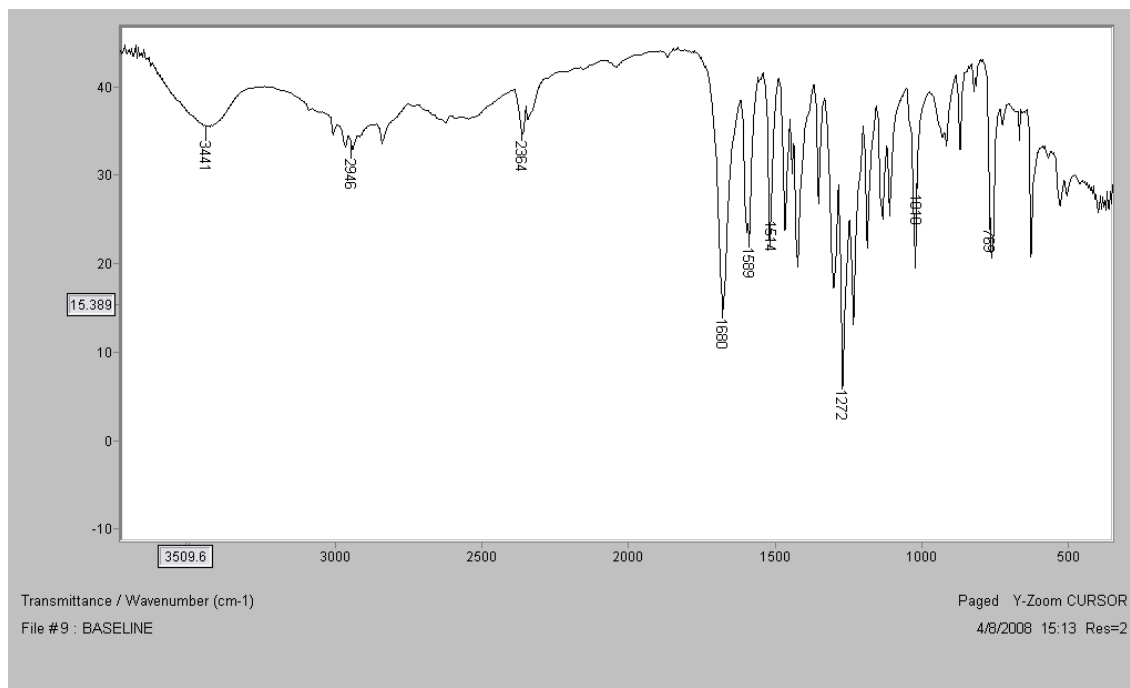
Anexo 04 – Espectro de RMN ¹H e RMN ¹³C (400 MHz e 100 MHz, acetona deuterada) do Ip-1 (Ácido Anísico)



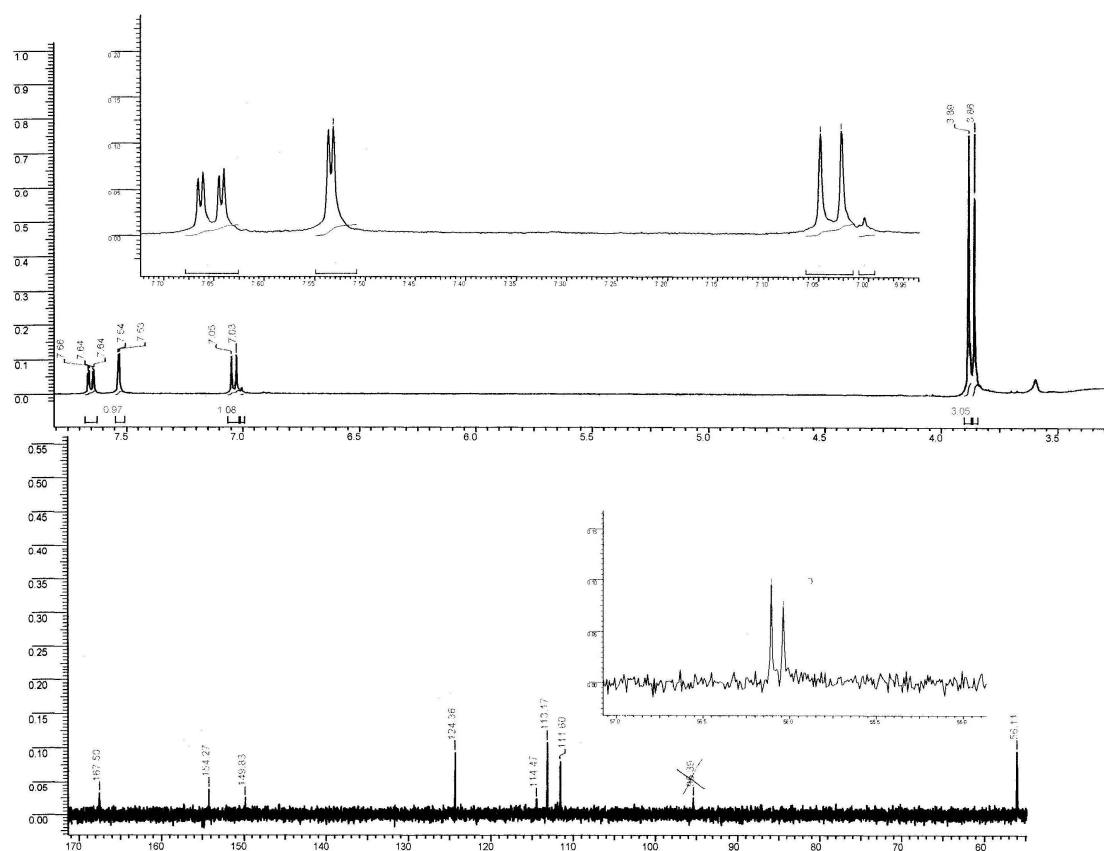
Anexo 05 – Espectro de Infravermelho (KBr) do Ip-2 (Ácido Verátrico)



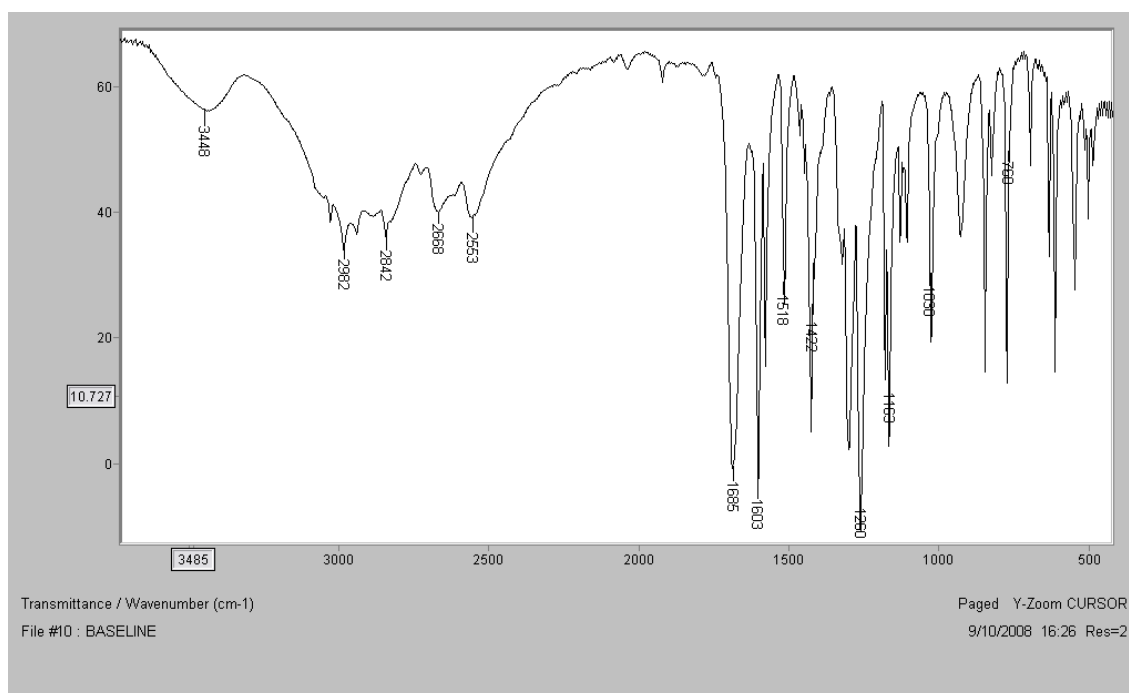
Anexo 06 – Espectro de Infravermelho (KBr) do Ip-5 (Ácido Verátrico)



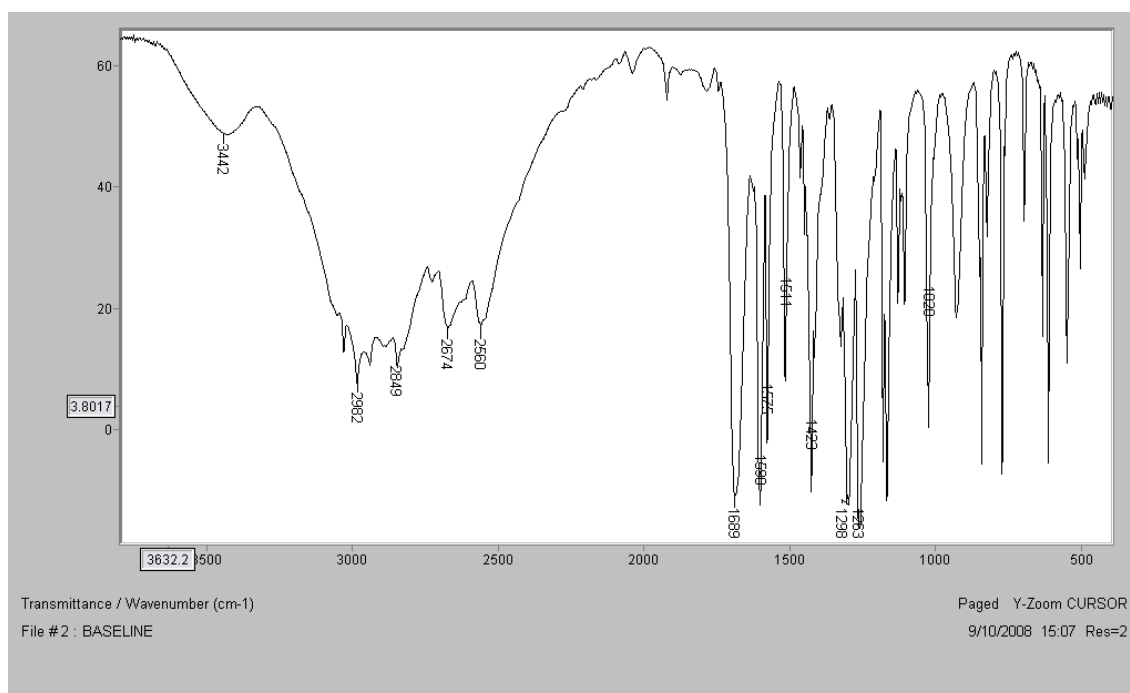
Anexo 07 – Espectro de RMN ^1H e RMN ^{13}C (400 MHz e 100 MHz, acetona deuterada) do Ip-2 (Ácido Verátrico)



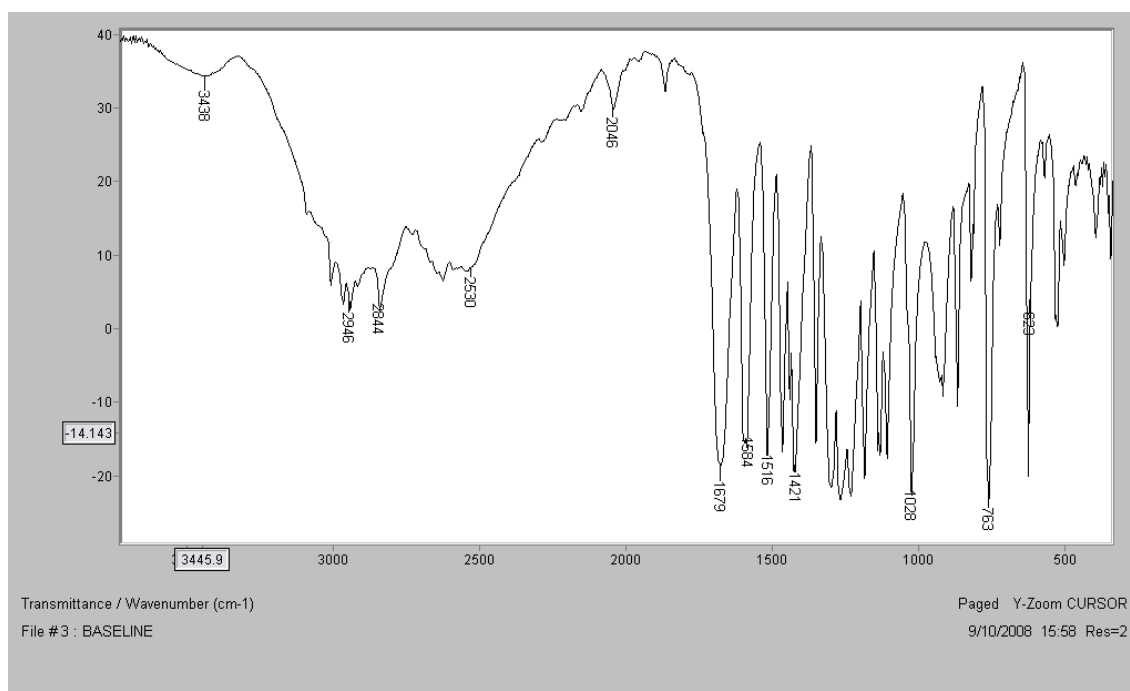
Anexo 08 – Espectro de Infravermelho (KBr) do Ip-6 (Ácido Anísico)



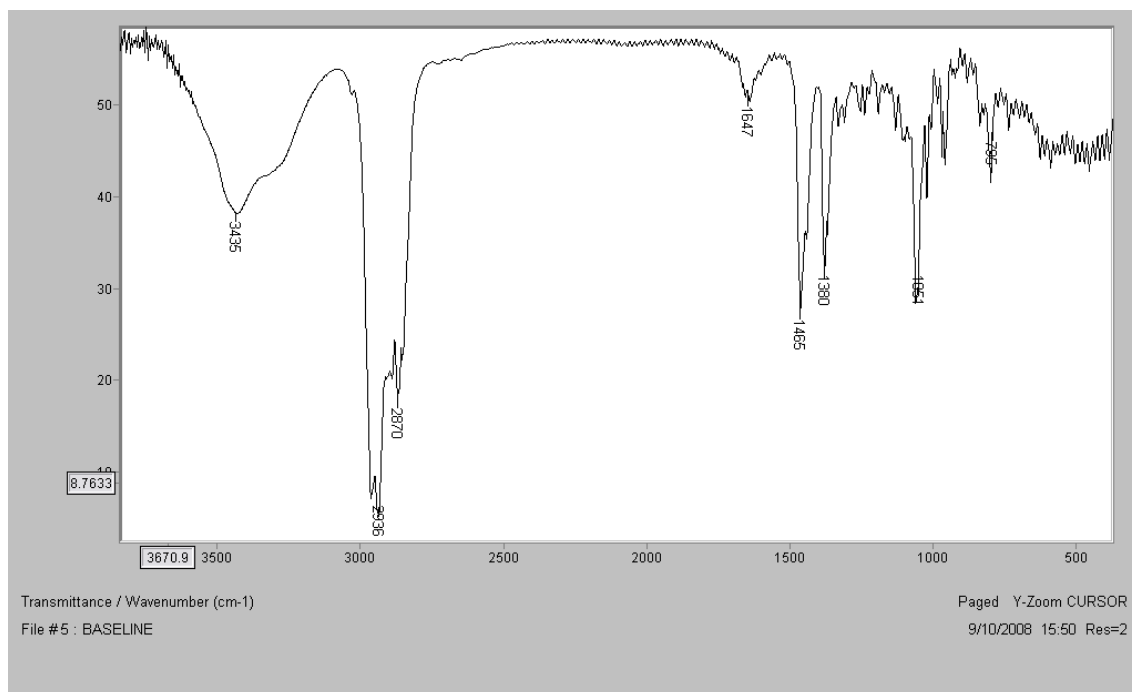
Anexo 09 - Espectro de Infravermelho (KBr) do Ip-9 (Ácido Anísico)



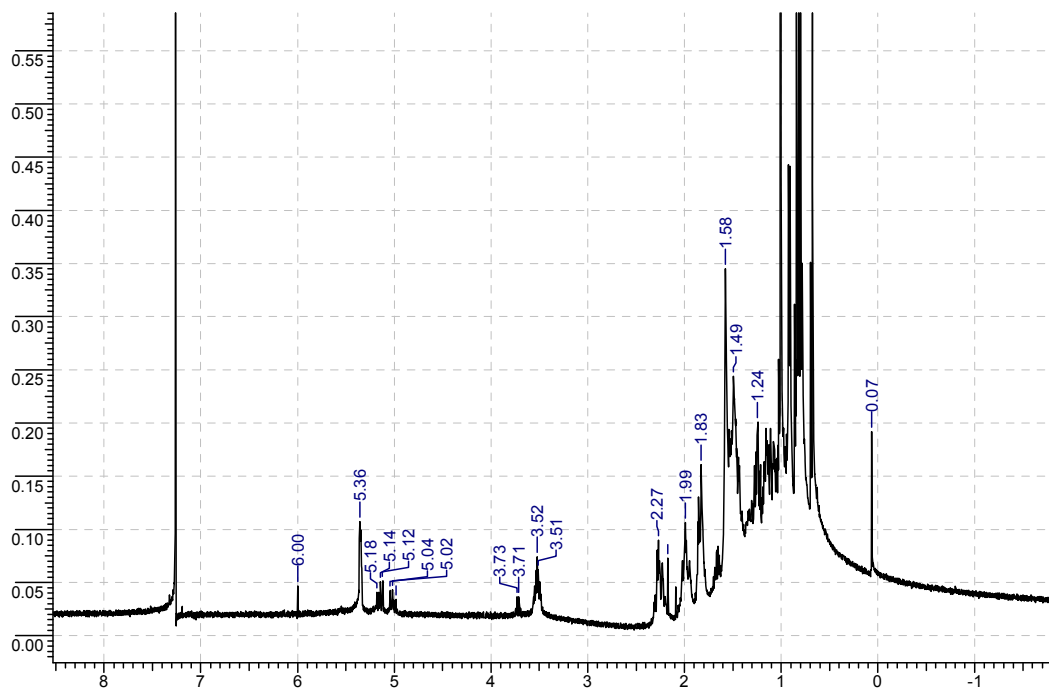
Anexo 10 - Espectro de Infravermelho (KBr) do Ip-7 (Ácido Verátrico)



Anexo 11 - Espectro de Infravermelho (KBr) do Ip-8 (β -Sitosterol)



Anexo 12 - Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) do Ip-8 (β -Sitosterol e Stigmasterol)



Anexo 13 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do Ip-8 (β -Sitosterol)

